

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**ESTUDO DA PROTEÍNA HUMANA CENTROSSOMAL
TBCCD1 EM CONDIÇÕES DE STRESS OXIDATIVO
CAUSADAS POR H₂O₂ EM ESTADO ESTACIONÁRIO**

Sara Isabel Guerra Carvalhal

MESTRADO EM BIOQUÍMICA
(ESPECIALIZAÇÃO EM BIOQUÍMICA MÉDICA)

2010

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**ESTUDO DA PROTEÍNA HUMANA CENTROSSOMAL
TBCCD1 EM CONDIÇÕES DE STRESS OXIDATIVO
CAUSADAS POR H₂O₂ EM ESTADO ESTACIONÁRIO**

Sara Isabel Guerra Carvalhal

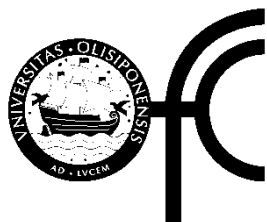
DISSERTAÇÃO ORIENTADA PELA PROF. DR.^a HELENA SOARES E PROF DR.^a LUÍSA CYRNE

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

(ESPECIALIZAÇÃO EM BIOQUÍMICA MÉDICA)

2010

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica**



**Fundação Calouste Gulbenkian
Instituto Gulbenkian de Ciência**



ESTUDO DA PROTEÍNA HUMANA CENTROSSOMAL TBCCD1 EM CONDIÇÕES DE STRESS OXIDATIVO CAUSADAS POR H₂O₂ EM ESTADO ESTACIONÁRIO

SARA ISABEL GUERRA CARVALHAL

DISSERTAÇÃO ORIENTADA PELA PROF. DR.^a HELENA SOARES E PROF DR.^a LUÍSA CYRNE

MESTRADO EM BIOQUÍMICA COM ESPECIALIZAÇÃO EM BIOQUÍMICA MÉDICA

2010

Índice

Agradecimentos	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Abreviaturas e símbolos	ix
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....	1
Parte I – TBCCD1 e γ-tubulina, duas proteínas centrossomais	1
I.1 Microtúbulos.....	1
I.2 Nucleação dos microtúbulos	3
I.3 γ -tubulina, uma proteína chave na nucleação dos microtúbulos	3
I.4 Centrossoma.....	5
I.4.1 Estrutura e função do centrossoma	5
I.4.2 Ciclo de duplicação dos centrossomas	7
I.5 Via de <i>folding</i> da tubulina.....	8
I.6 Cofactores da tubulina	9
I.7 Proteínas relacionadas com os cofactores	13
I.7.1 E-like, uma proteína relacionada com o cofactor E	13
I.7.2 Proteínas relacionadas com o cofactor C (TBCC)	13
I.7.2.1 Retinitis pigmentosa protein 2 (RP2)	14
I.7.2.1 TBCC-domain containing protein 1 (TBCCD1)	17
Parte II – Peróxido de Hidrogénio	21
II.1 Espécies reactivas de oxigénio e stress oxidativo.....	21
II.2 Peróxido de hidrogénio (H_2O_2).....	21
II.2.1 Metabolismo do peróxido de hidrogénio (H_2O_2)	21
Fontes de H_2O_2	21
Remoção do H_2O_2	22
II.2.2 H_2O_2 como regulador.....	23
II.3 Metodologias de exposição de H_2O_2	24
II.3.1 <i>Bolus addition</i> de H_2O_2	24

II.3.1 Método glucose oxidase.....	25
II.3.1 Titulação de H ₂ O ₂ em estado estacionário	25
Parte III – Cancro	28
III.1 ERO e cancro.....	28
III.2 Centrossomas e cancro	30
III.2.1 Amplificação dos centrossomas como resultado de danos no DNA	31
Parte IV – Objectivos	33
CAPÍTULO II – MATERIAL E MÉTODOS.....	35
Parte I – Material e Equipamento	35
I.1 Linhas celulares	35
I.2. Reagentes.....	36
I.3 Equipamento	36
Parte II- Métodos	37
II.1 Condições de cultura celular.....	37
II.1.1 Procedimento comum às várias experiências.....	38
II.2 Determinação das condições para o estabelecimento de estado estacionário de H ₂ O ₂	38
II.2.1 Determinação da concentração de H ₂ O ₂	39
II.2.1.1 Determinação da curva-padrão.....	39
II.2.1.2 Determinação da concentração de H ₂ O ₂ presente no ensaio	39
II.2.2 Actividade do glucose oxidase (E.C.1.1.3.4)	40
II.2.3 Ensaio de consumo do H ₂ O ₂ em células intactas	40
II.2.4 Determinação da concentração de H ₂ O ₂ em estado estacionário presente no ensaio	41
II.3 Ensaio de viabilidade celular	41
II.4 Ensaio cinético do catalase (E.C. 1.11.1.6)	42
II.5 Preparação de extractos proteicos	43
II.5.1 Preparação de extractos proteicos totais.....	43
II.5.2 Preparação de extractos proteicos citosólicos e nucleares	43
II.5.3 Preparação de extractos proteicos citosólicos e solubilização do sedimento	44
II.6 <i>Western blotting</i>	44
II.6.1 Determinação da concentração proteica	44

II.6.2 Electroforese de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturantes (SDS-PAGE)	45
II.6.3 Electrotransferência de proteínas para membrana de nitrocelulose	46
II.6.4 <i>Western blotting</i>	46
II.7 Microscopia de Imunofluorescência.....	47
II.8 Avaliação da capacidade de nucleação por parte do centróssoma em células submetidas a um estado estacionário de H ₂ O ₂	48
II.9 Análise do tamanho celular por citometria de fluxo	49
II.10 RT-PCR semi-quantitativo	49
II.10.1 Electroforese de DNA.....	49
II.10.2 Extração de RNA total de linhas celulares	49
II.10.3 Síntese de cDNA	50
II.10.4 Análise da expressão de genes <i>tbccd1</i> , <i>tbcc</i> , <i>rp2</i> , <i>γ-tubulina</i> em células submetidas a um estado estacionário de H ₂ O ₂ por PCR semi quantitativo	50
II.11. Análise estatística	52
CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
Parte I – Otimização das condições de estabelecimento em estado estacionário	53
I.1 Calibração das condições de estabelecimento do estado estacionário	54
I.1.1 Actividade do glucose oxidase	54
I.1.2 Consumo de H ₂ O ₂ por células intactas	54
A- Determinação da constante de velocidade de consumo de H ₂ O ₂ em células HeLa	55
B- Determinação da constante de velocidade de consumo de H ₂ O ₂ em células RPE-1	55
C- Determinação da constante de velocidade de consumo de H ₂ O ₂ em células RPE-1 que sobre-expressam a proteína de fusão TBCCD1-GFP.....	56
I.2 Determinação da concentração extracelular de H ₂ O ₂ a usar em estado estacionário ...	57
Parte II – Análise da influência da sobre-expressão de TBCCD1 no consumo intracelular de H₂O₂	61
II.1. Análise do tamanho das células RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 5.....	61
II.2. Ensaio cinético do catalase	62
Parte III.– Análise da influência do H₂O₂ nos níveis de proteína TBCCD1	64
III.1 Análise da influência do estado estacionário de H ₂ O ₂ na proteína TBCCD1 em células HeLa.....	64

III.1.1 Estudo da variação dos níveis de proteína TBCCD1 induzido pelo estado estacionário de H ₂ O ₂ em células HeLa	64
III.1.2 Estudo da expressão dos genes <i>tbccd1</i> e proteínas relacionadas em células submetidas um estado estacionário de H ₂ O ₂	69
III.2 Estudo da variação dos níveis de proteína TBCCD1 pelo estado estacionário de H ₂ O ₂ em células RPE-1	71
III.2.1 Estudo da variação dos níveis de proteína TBCCD1 pelo estado estacionário de H ₂ O ₂ em células RPE-1 TBCCD1–GFP Clone 5	71
Parte IV.– Análise da influência do H₂O₂ na proteína γ-tubulina	73
IV.1 Análise da influência do estado estacionário de H ₂ O ₂ na proteína γ -tubulina em células HeLa.....	74
IV.1.1 Estudo da variação dos níveis de γ -tubulina induzido pelo estado estacionário de H ₂ O ₂ em células HeLa.....	74
IV.1.2 Avaliação da capacidade de nucleação por parte do centrossoma em células submetidas um estado estacionário de H ₂ O ₂	80
IV.1.3 Estudo da expressão do gene γ -tubulina em células submetidas um estado estacionário de H ₂ O ₂	86
IV.1.3.1. Optimização das condições de análise	86
IV.1.3.1. Estudo do padrão de expressão do gene γ -tubulina em células HeLa em resposta a um estado estacionário de H ₂ O ₂	87
IV.2 Análise da influência do H ₂ O ₂ nos níveis da proteína γ -tubulina em células RPE-1 ...	88
CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	91
CAPÍTULO V – REFERÊNCIAS.....	95

Agradecimentos

Terminada esta fase acredito que não se fechou um ciclo mas muito pelo contrário, creio ter dado os meus primeiros passos na investigação. Embora esta etapa apenas represente o início da minha carreira como investigadora, não poderia termina-la sem antes agradecer às minhas orientadoras, professora doutora Luísa Cyrne e professora doutora Helena Soares, por me terem aceitado no grupo de Bioquímica dos Oxidantes e Antioxidantes, CQB, FC, UL.

Obrigada toda a disponibilidade, pelas proveitosas discussões, pela ajuda nos momentos mais complicados e, por me ajudarem a desenvolver uma observação crítica sob a ciência. Agradeço por acreditarem em mim, por me fazerem ir sempre mais longe e por toda a confiança depositada.

Embora não tenham sido meus orientadores oficiais, não posso deixar de agradecer ao professor doutor Fernando Antunes, à professora doutora Susana Marinho e à doutora Carla Real pelo auxílio e apoio. Agradeço de um modo especial ao professor Fernando pela preciosa ajuda no início deste trabalho experimental.

Obrigada, sem qualquer exceção, e com um especial carinho por cada, Ana Matias, Verónica Brito, Francisco Aresta Branco, Andreia Cepeda, Filipa Cunha, Juan Rodrigues, Ruben Ramalho, Alexandra Tavares, João Gonçalves, Joana Pinto, Daniela Grácio, Tânia Baltazar por tornáreis o laboratório num lugar prazeroso e ainda, por de algum modo me marcáreis ao longo deste ano. Um agradecimento especial à Xana e ao João pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho. O companheirismo deste laboratório é a sua imagem de marca.

Quero agradecer também à doutora Sofia Nolasco e ao professor doutor Juan Carlos Zabala pela ajuda na resolução de algumas dificuldades ao longo deste ano.

Ao grupo de Enzimologia e ao grupo *Membrane Protein Disorders*, o meu muito obrigada pelo apoio prestado.

Agradeço àqueles com quem me cruzei todos os dias no corredor por de alguma maneira me alegrarem mesmo com um simples sorriso.

Gostaria de agradecer de um modo especial aos meus amigos:

ao PC por ser o amigo que é, por estar sempre presente e me ajudar a tornar na pessoa que sou hoje.

à Sónia e à Fabi por acreditarem sempre em mim.

à Ana Filipa, ao Armando, ao Bruno, ao Daniel, à Mariana, ao Miguel e à Soraia. Obrigada por desde cedo facilitáreis a minha ida para Lisboa e também por me aceitáreis tal como sou. Agradeço de um modo especial aos meninos do lado pelo que me aturavam quando as coisas corriam menos mal ou bem demais! Agradeço ainda ao Daniel porque sim!

Por último agradeço à minha família, em especial às minhas maninhas, aos meus pais e à minha avó Judite. Obrigada por me ajudarem em tudo, mesmo que isso por vezes significa-se multiplicarem-se. Um especial obrigada à Carlota e à Patrícia por vos esforçareis em perceber o que é o TBCCD1. Agradeço também ao Hugo não só pela sua ajuda, mas também por nunca desesperar ao adiar uma vinda a casa.

Muito obrigada!

Resumo

O peróxido de hidrogénio (H_2O_2) embora seja um oxidante relativamente fraco, é capaz de alterar o nível de oxidação dos grupos tióis ao reagir com resíduos de cisteínas. Essas propriedades tornam o H_2O_2 uma das espécies reactivas de oxigénio (ERO) com potencialidade para participar em vias de sinalização. Deste modo, o desencadeamento de uma determinada via de sinalização, ou a sua modulação, deverá ocorrer pelo aumento temporário das concentrações de H_2O_2 , como por exemplo, durante a resposta inflamatória. Por outro lado, a exposição prolongada a algumas ERO têm vindo a ser relacionada com o início, progressão e desenvolvimento tumoral. Muitos dos tumores são caracterizados por aneuploidia e anormalidades centrossomais. Por exemplo, células de mamífero expostas a H_2O_2 , por *bolus addition*, apresentam centrossomas supra-numerários. Neste contexto iniciou-se o estudo da influência de concentrações sinalizadoras de H_2O_2 nos níveis de duas proteínas centrossomais, a proteína TBCCD1 (*TBCC-domain containing protein 1*) e a γ -tubulina nas linhas celulares humanas HeLa e hTERT-RPE-1. O TBCCD1 é um potencial regulador do posicionamento do centrossoma e da organização citoplasmática, a γ -tubulina é uma proteína chave na nucleação dos microtúbulos nos centros organizadores de microtúbulos, como o centrossoma.

Por *western blot* mostrou-se, em ambas as linhas celulares, o aumento dos níveis de TBCCD1 ao longo do tempo de exposição de H_2O_2 em estado estacionário. A análise da velocidade de consumo de H_2O_2 em células hTERT-RPE-1 que sobre-expressam a proteína de fusão TBCCD1-GFP mostrou um relação directa desta com o aumento dos níveis de TBCCD1-GFP. Esta proteína, na presença de H_2O_2 , varia de modo análogo à proteína endógena. Estudos similares mostraram a diminuição dos níveis de γ -tubulina ao longo do tempo de exposição de H_2O_2 . Por microscopia de imunofluorescência indirecta observou-se também a diminuição dos níveis desta proteína no centrossoma em células HeLa. Observou-se ainda uma alteração da capacidade de nucleação dos microtúbulos pelo centrossoma e uma modificação na organização destes após repolimerização em células previamente tratadas com nocodazole e após remoção desta.

No conjunto, estes resultados mostram que ambos os níveis destas proteínas variam na presença de baixas concentrações de H_2O_2 , constituindo este trabalho uma abordagem inicial do efeito do H_2O_2 em concentrações reguladoras no centrossoma.

Palavras-chave: estado estacionário de H_2O_2 , TBCCD1, γ -tubulina, centrossoma

Abstract

The hydrogen peroxide (H_2O_2) although a relatively weak oxidant, is highly reactive with sulfhydryl groups. These properties make the H_2O_2 a reactive oxygen species (ROS) with the potential to participate as a regulator in signaling pathways. Thus, the temporary increase in the concentrations of H_2O_2 should trigger or modulate a signal pathway, such as during the inflammatory response. Moreover, prolonged exposure to some ROS has been related with the initiation, progression and tumor development. Many tumors are characterized by aneuploidy and centrosomal abnormalities. For example, mammalian cells exposed to H_2O_2 by bolus addition showed supra-numerary centrosomes. In this context we began the study of the influence of signaling concentrations of H_2O_2 in the levels of two centrosomal proteins, protein TBCCD1 (TBCC domain-containing protein 1) and γ – tubulin in HeLa and hTERT-RPE-1 human cell lines. The TBCCD1 is a potential regulator of the positioning of the centrosome and cytoplasmic organization and the γ – tubulin is a key protein in the nucleation of microtubules on microtubule organizing centers, such as the centrosome.

By western blot, we detected in both cell lines, increased levels of TBCCD1 over time of exposure to a steady state of H_2O_2 . The analysis of H_2O_2 consumption by intact hTERT-RPE-1 cells that over-expresses the fusion protein TBCCD1-GFP showed a direct relationship of this with increased levels of TBCCD1-GFP. Noteworthy, in the presence of H_2O_2 , the TBCCD1-GFP levels, showed the same variation that those of the endogenous protein. Similar studies showed that γ – tubulin levels decreased of upon an exposition to H_2O_2 . By immunolocalization microscopy we observed in HeLa cells a decrease of γ – tubulin's levels at the centrosome. To investigate if this observation has an impact in the ability of centrosomes to nucleate microtubules we have treated HeLa cells, previously exposed to steady-state levels of H_2O_2 , with the antimitotic drug nocodazole. After washing out this microtubule depolymerizing agent we follow microtubule repolymerization by immunofluorescence microscopy. We observed that cells treated with H_2O_2 present a different ability to nucleate microtubules in comparison to control cells. At end these cells presented a distinct organization of the microtubule cytoskeleton.

Taken together the results presented in this work show that a low concentration of H_2O_2 promotes a variation of the TBCCD1 and γ – tubulin's levels. Therefore, this work constitutes an initial approach to the study of the impact at the centrosome of H_2O_2 at levels expected for a signaling role.

Keywords: steady state of H_2O_2 , TBCCD1, γ -tubulin, centrosome

Abreviaturas e símbolos

$V_{H_2O_2}$ - velocidade de consumo de H_2O_2 intracelular

V_{GO} - velocidade de produção de H_2O_2 pelo glucose oxidase

γ -TuRCs - γ -tubulin ring complexe

γ -TuSCs - γ -tubulin small complexes

$[H_2O_2]_{ex}$ - concentração de H_2O_2 extracelular

$[H_2O_2]_{in}$ - concentração de H_2O_2 intracelular

1O_2 - oxigénio singleto

3-AB PARP - 3-amino benzamide (3-AB)

8-OHdG - 8-hidroxideoxiguanosina

A- área da célula

ADP - ribosylation factor-like protein 3

Arl2 - ADP ribosylation factor-like protein 2

ATM - Ataxia telangiectasia mutated

BER - reparação de excisão de bases

BSA - albumina do soro bovino

CARP - cyclase-associated proteins

C-Coil - domínio coiled-coil

CCT-cytosolic-chaperonin-containing TCP1

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindole

DMEM – Meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle*

DMSO - dimetilsulfóxido

DTT – ditioneitol

EGF - *epidermal growth factor*

ERO – espécie reactiva de oxigénio

FBS - soro fetal de bovino

GAP - *GTPase activating proteins*

GCPs - γ -tubulin complex proteins

GFP - proteína fluorescente verde

GPx - glutathione peroxidase

GSH – glutathione

H_2O_2 - peróxido de hidrogénio

HO^\bullet - radical hidroxilo

HPRT - hipoxantina guanina fosforibosil transferase 1

ILK - integrin-linked kinase

k - constante de velocidade de consumo de primeira ordem

LRR - <i>Leucine rich repeats</i>	MAPs - proteínas associadas a microtúbulos
	MCF-7 – linha celular de cancro da mama
MTOCs - centros organizadores de microtúbulos	RP2 - <i>Retinitis pigmentosa protein 2</i>
MTT - azul de tiazolilo	RT-PCR - reacção do transcriptase reversa seguida da reacção em cadeia do polimerase
NDKs - nucleotídeo-difosfato-cinases	SDS - dodecilo sulfato de sódio
NDPk - <i>Nucleoside diphosphate kinase</i>	SDS-PAGE – <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
NO - óxido nítrico	SOD - superóxido dismutase
NP-40 - igepal CA630 (Nonidet-p40)	SODs - superóxido dismutase
$O_2^{\bullet -}$ - anião superóxido	SSBs - <i>DNA single-strand breaks</i>
Pak1 - <i>p21-activated kinase 1</i>	TBCA – TBCE – cofactor de tubulina A – E
PARP - <i>poly (ADP-ribose) polymerase</i>	TBCCD1- <i>TBCC-domain containing protein1</i>
PBS - solução tampão fosfato-salino	TBCs - cofactores de tubulina
PCM - material pericentriolar	TEMED - N,N,N,N-Tetrametiletilenodiamina
P_s – permeabilidade celular	UBL – domínio <i>ubiquitin-like</i>
PSA - persulfato de amónio	V_{in} - volume intracelular da célula
ROOH - hidroperóxidos orgânicos	

Capítulo I – Introdução

Parte I – TBCCD1 e γ -tubulina, duas proteínas centrossomais

I.1 Microtúbulos

O citoesqueleto das células eucarióticas é uma rede filamentosa composta por três tipos diferentes de fibras: filamentos de actina (F-actina), microtúbulos e filamentos intermédios (Lopez-Fanarraga *et al*, 2001). Estas fibras são compostas por subunidades proteicas que polimerizam, diferem de diâmetro, composição e função específica.

Os microtúbulos são polímeros polarizados em que a sua subunidade funcional e estrutural é o heterodímero α - e β -tubulina, genericamente designado por tubulina (revisto em Lüders & Stearns, 2007).

Os heterodímeros de α - e β -tubulina associam-se topo a topo, por ligações não covalentes, formando o protofilamento. Este, por sua vez, organiza-se radialmente interagindo lateralmente com outros protofilamentos dando origem a um tubo oco denominado por microtúbulo.

Cada microtúbulo tem tipicamente 13 protofilamentos. Dado o modo de associação dos heterodímeros, o microtúbulo apresenta duas extremidades distintas, uma com a α -tubulina exposta e outra com a β -tubulina, as quais se designam respectivamente por extremidade “-“ e “+”. Assim, devido ao tipo de arranjo e orientação da tubulina, aquando da polimerização os microtúbulos tem uma polaridade intrínseca que se reflecte na sua capacidade de polimerizar (Desai & Mitchison, 1997).

A polimerização das subunidades de tubulinas é dependente da promoção da actividade de hidrólise de GTP da β -tubulina. Embora tanto a α - como a β -tubulina contenham um local de ligação ao GTP no seu domínio N-terminal, apenas a β -tubulina possui uma actividade de GTPase. Os heterodímeros de tubulina só polimerizam se a β -tubulina se encontrar ligada ao GTP. Logo que polimerizam, as interações entre os dímeros levam a alterações conformacionais do heterodímero que têm como consequência a hidrólise do GTP da β -tubulina. Deste modo, a hidrólise é ligeiramente atrasada relativamente ao momento que o heterodímero integra o polímero. Por conseguinte, um microtúbulo a polimerizar activamente a extremidade “+” apresenta um maior conteúdo de subunidades ligadas ao GTP, conteúdo este que diminui progressivamente no sentido da extremidade oposta. Este fenómeno leva a que a extremidade “-“ tenha uma menor taxa de polimerização relativamente à extremidade “+” pois, enquanto o microtúbulo apresentar na sua extremidade “+” subunidades que possuam β -tubulina ligada ao GTP este continuará a polimerizar. Porém, se a adição de subunidades à extremidade “+” abrandar é possível que a “onda” de hidrólise do GTP ao longo da parede do microtúbulo atinga a extremidade do polímero, a qual é caracterizada por heterodímeros de

tubulina contendo β -tubulina GDP. Devido à conformação específica destes heterodímeros, as interações entre as subunidades dos protofilamentos adjacentes afrouxam levando à curvatura dos protofilamentos e consequentemente à sua despolimerização (revisto em Nogales, 2000).

Como já referido, devido às características estruturais do heterodímero de tubulina os protofilamentos são estruturalmente polares, pelo que existirá taxas de polimerização/despolimerização distintas nas duas extremidades.

De facto, a extremidade “+” apresenta a capacidade de polimerizar a partir de uma concentração crítica de tubulina mais baixa que a extremidade “-“ e, consequentemente um crescimento mais rápido que a extremidade oposta. Embora ambas as extremidades dos microtúbulos possam crescer e encurtar pelo ganho/perda de subunidades *in vivo*, na maior parte dos casos a extremidade “-“ não apresenta dinâmica uma vez que se encontra ancorada nos centros organizadores de microtúbulos (MTOCs), como por exemplo o centrossoma, o principal MTOC das células animais.

Por consequência, *in vivo* a dinâmica de polimerização/despolimerização dos microtúbulos depende essencialmente da dinâmica da sua extremidade “+”. Deste modo, os microtúbulos apresentam uma capacidade de sofrerem ciclos de crescimento e encurtamento rápido, a qual se denomina por instabilidade dinâmica (Mitchison & Kirschner, 1984).

Os microtúbulos são uma estrutura crucial para a vida celular (Wang & Nogales, 2005) tendo um papel determinante na sua organização espacial. De facto, intervêm em inúmeras funções tais como no transporte intracelular, quer de proteínas, quer de organelos; na organização do retículo endoplasmático e complexo de Golgi, na mobilidade celular, nas vias de transmissão de sinais e na segregação dos cromossomas durante a meiose e mitose onde são os principais componentes dos fusos mitóticos e meióticos (Hage-Sleiman *et al*, 2010; Amos & Schlieper, 2005; Wang & Nogales, 2005).

Os microtúbulos fazem ainda parte de estruturas especializadas, com funções específicas, como os axonemas ciliares, os centríolos e os corpos basais.

Esta diversidade de funções reside na capacidade dinâmica dos microtúbulos, a qual depende entre outros (i) da existência de diferentes isótipos de α - e β -tubulina derivados da existência de famílias multigénicas cujos membros são regulados diferencialmente; (ii) da ocorrência de diferentes modificações pós-traducionais no heterodímero de tubulina; (iii) da interação com proteínas que interagem com os microtúbulos, as MAPs (proteínas associadas a microtúbulos) e proteínas motoras; (iv) da actividade de diferentes MTOCs; (v) da actividade dos membros da via de *folding* da tubulina, chaperones moleculares e cofactores de tubulina, que regulam a maturação e reciclagem dos heterodímeros de tubulina (Nolasco *et al*, 2005; Lopez-Fanarraga *et al*, 2001, Nogales, 2000).

I.2 Nucleação dos microtúbulos

Estudos *in vitro* mostraram que a tubulina é capaz de polimerizar quando presente em concentrações críticas, porém *in vivo*, estes são capazes de polimerizar a partir de concentrações críticas de tubulina significativamente mais baixas, o que indica que as células possuem mecanismos que assistem à nucleação dos microtúbulos.

Tal como referido anteriormente, nas células animais o centrossoma é o principal centro organizador de microtúbulos (MTOC) enquanto o *spindle pole bodies* (corpos polares do fuso) é em leveduras (Pereira & Schiebel, 1997; Lüders, & Stearns, 2007). Porém, outros organelos como o complexo de Golgi são igualmente capazes de nuclear/organizar microtúbulos (Chabin-Brion *et al*, 2001).

Para o microtúbulo se formar é preciso criar uma base de heterodímeros α - e β -tubulina estável a partir da qual ocorre o alongamento, ou seja, para que o microtúbulo comece a polimerizar é requerida a nucleação de um número crítico de subunidades de tubulina.

In vivo a nucleação dos microtúbulos ocorre nos MTOCs. No caso do centrossoma a nucleação da tubulina dá-se a partir do seu material pericentriolar (o qual será posteriormente discutido) e requer um complexo multiproteico em forma de anel, o γ -tubulin ring complex (γ -TuRCs) que contém a γ -tubulina (Bartolini & Gundersen, 2006).

O γ -TuRC permite criar a base para que a polimerização dos heterodímeros de α - e β -tubulina ocorra. Actualmente sabe-se que os γ -TuRCs são capazes de regular a dinâmica dos microtúbulos e polimerizar microtúbulos em regiões discretas no citoplasma, ou seja de realizar a nucleação acentrossomal de microtúbulos (revisto em Bartolini & Gundersen, 2006).

I.3 γ -tubulina, uma proteína chave na nucleação dos microtúbulos

A γ -tubulina é uma proteína ubíqua que foi identificada pela primeira vez como o produto do gene *mipA* em *Aspergillus nidulans* (Oakley & Oakley, 1989). Neste estudo os autores mostraram que a γ -tubulina é requerida para a formação dos microtúbulos do *spindle pole body* da levedura (Oakley & Oakley, 1989).

A γ -tubulina é conservada filogeneticamente e apresenta uma elevada homologia com as α - e β -tubulina pelo que, é um membro da super família das tubulinas (Fuller *et al*, 1995). Esta proteína, ao contrário da α - e β -tubulina, não é capaz de formar protofilamentos não integrando a parede do microtúbulo, porém, pode-se associar à extremidade que se encontra ligada ao centrossoma, isto é à extremidade “-“ do microtúbulo (Wiese & Zheng, 2000). A

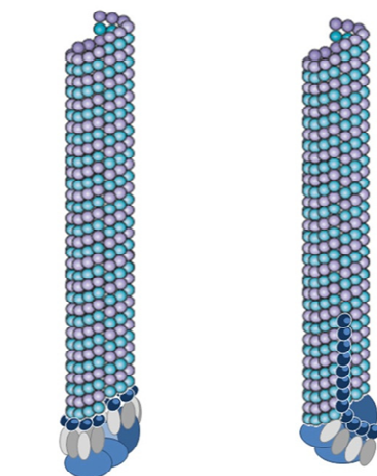
γ -tubulina localiza-se no material pericentrional (PCM) e centríolos (Fuller *et al*, 1995) dos centrossomas, existindo também na fracção citosólica da célula.

Como referido anteriormente, a γ -tubulina encontra-se associada aos GCPs, *γ -tubulin complex proteins* formando assim o γ -TuRC. Os γ -TuRCs têm uma estrutura em estrela altamente conservada.

Para além de formar estes complexos, a γ -tubulina é igualmente capaz de se associar a complexos de menor dimensão, os *γ -tubulin small complexes* (γ -TuSCs). O γ -TuSC é composto pela γ -tubulina e por mais duas proteínas, a GCP2 e a GCP3. O complexo γ -TuRC para além destas proteínas contém ainda o conjunto de proteínas GCP4, 5 e 6 e GCP-WD (originalmente conhecida por NEDD1) (Bouissou *et al*, 2009; Raynaud-Messina & Merdes, 2007) .

A γ -tubulina é crítica para a nucleação dos microtúbulos. Actualmente existem dois modelos propostos para a nucleação dos microtúbulos a partir dos complexos γ -TuRC: o modelo do molde e o modelo do protofilamento (ver figura I.1).

A- Modelos de nucleação dos microtúbulos



A1-Modelo do molde

A2-Modelo do protofilamento

B- Complexo γ -TuRC

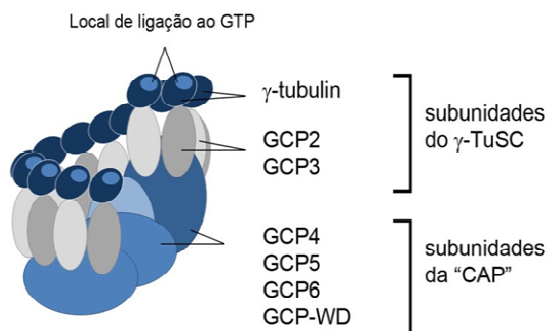


Figura I.1: **Modelos de nucleação dos microtúbulos a partir do complexo γ -TuRC:** Modelo do molde e Modelo do protofilamento. Em (A) encontram-se representados os dois modelos propostos actualmente para o modo de nucleação dos microtúbulos. No caso do modelo do molde (A1) propõe-se que a proteína a γ -tubulina do complexo γ -TuRC se associe em forma de anel e sirva de base/molde para a nucleação. O modelo do protofilamento (A2) sugere que a γ -tubulina forme um protofilamento, o qual será alongado por heterodímeros de α - e β -tubulina.

Em (B) encontra-se esquematizado a possível oligomerização do complexo γ -TuRC, o qual serve de base para a nucleação dos microtúbulos. A γ -tubulina em conjunto com GCP 2 - 6 e a proteína GCP-WD formam o complexo o γ -TuRC, sendo as proteínas GCP 4 - 6 e GCP-WD as proteínas "Cap", as quais são responsáveis por manter a associação do complexo (Adaptado de Wiese & Zheng, 2006; Conde & Cáceres, 2009 e Gonçalves, 2010).

O **modelo do molde** propõe que a γ -tubulina se associa lateralmente ao γ -TuRC criando um “molde” a partir do qual o microtúbulo é nucleado pelas associações longitudinais dos heterodímeros de tubulina. O **modelo do protofilamento** propõe que a γ -tubulina se associe longitudinalmente ao γ -TuRC, isto é, se associe de topo a topo. Esta associação cria uma espécie de protofilamento de γ -tubulina e permite servir de base para a formação dos protofilamentos de α - e β -tubulina, os quais se organizaram radialmente e originando o microtúbulo (Nogales, 2001).

Estudos recentes envolvem o complexo γ -TuRC, para além da nucleação, na regulação e dinâmica dos microtúbulos (Raynaud-Messina & Merdes, 2007). Estas poderão não ser as únicas funções do γ -TuRC uma vez que, a inibição do complexo γ -TuRC activa o *spindle assembly checkpoint*, o qual garante a correcta segregação dos cromossomas entre a passagem da metafase à anafase da mitose (Müller *et al*, 2006).

I.4 Centrossoma

I.4.1 Estrutura e função do centrossoma

O centrossoma foi descrito pela primeira vez por Boveri em 1888 (Boveri, 1888; revisto em Bettencourt-Dias & Glover, 2007) e é composto por um centríolo mãe (ou maduro) e outro filho (ou imaturo) orientados ortogonalmente e rodeados por um material de natureza proteica denominado material pericentriolar (PCM), ver figura I.2.

Cada centríolo é uma estrutura especializada de microtúbulos. O centríolo canónico tem uma forma de barril (*barrel-shaped*) derivada da disposição simétrica e radial de 9 tripletos de microtúbulos (Lüders & Stearns, 2007). Por sua vez, cada triplete é constituído por um microtúbulo completo e dois incompletos (Doxsey, 2001). O centríolo é uma estrutura extremamente resistente, uma vez que os seus microtúbulos resistem a agentes despolimerizantes como o frio ou o nocodazole o que em parte parece estar relacionado com as modificações pós-traducionais da tubulina centriolar, nomeadamente a poliglutamilacção (Janke *et al*, 2008).

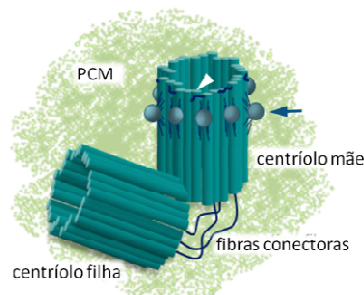


Figura I.2: **Centrossoma em células de mamífero.** Esquema representativo de um centrossoma típico de uma célula animal. O centrossoma é composto por um centríolo mãe e um centríolo filho orientados ortogonalmente. Estes são formados cada um por nove tripletos e, cada triplete por um microtúbulo

incompleto e dois microtúbulos completos. Os centríolos encontram-se ligados por fibras conectoras, também chamadas de fibras inter-conectoras, e rodeados pelo material pericentriolar (PCM). As pontas de seta a branco indicam os apêndices distais e as setas a azul os apêndices sub-distais.

A composição do centríolo mãe difere da do centríolo filho pois, o centríolo maduro, o mais velho apresenta apêndices sub-distais e fibras de transição/ apêndices distais (Debec *et al*, 2010).

O centríolo mãe pode ancorar-se à membrana e organizar a estrutura de um cílio ou de um flagelo, passando nesse momento a designar-se como corpo basal (Lange, 2002). A passagem de centríolo a corpo basal implica algumas alterações estruturais e bioquímicas, como a aquisição de apêndices adicionais. Serão as propriedades dos corpos basais que definirão algumas características dos cílios, como por exemplo a localização (Debec *et al*, 2010).

O PCM rodeia os centríolos e corresponde a uma matriz electrodensa composta por proteínas. A organização desta estrutura é ainda bastante desconhecida, contudo, por análise proteómica, tem-se vindo a identificar cada vez mais proteínas (Bornens & Moudjou, 1999; Andersen, 1999). De um modo geral, e tendo em conta as suas funções, podem-se caracterizar quatro grupos de proteínas centrossomais (Lange, 2002): (i) proteínas responsáveis por manter a estrutura centrossomal; (ii) proteínas responsáveis pela nucleação dos microtúbulos como a γ -tubulina; (iii) elementos de ancoragem, os quais criam uma interface entre as proteínas nucleadoras de microtúbulos e os elementos reguladores. A pericentrina é uma das proteínas de ancoragem mais bem caracterizadas (Delaval & Doxsey, 2010); (iv) moléculas reguladoras e sinalizadoras como cinases e fosfatases.

Observou-se que na ausência dos centríolos ocorre a dispersão do PMC, pelo que, embora o centríolo mãe tenha capacidade de ancorar microtúbulos, a principal função dos centríolos no centrossoma parece ser o recrutamento e a organização do PCM (Doxsey, 2001).

Devido à capacidade organizadora de microtúbulos, o centrossoma está implicado nas funções dependentes dos microtúbulos tais como, a manutenção da forma da célula ou a organização espacial dos organelos e o estabelecimento de polaridade celular (Hage-Sleiman *et al*, 2010). Esta capacidade de nucleação de microtúbulos é a função classicamente atribuída ao centrossoma. Contudo, este participa em mecanismos de resposta a stress e danos no DNA, no controlo do *checkpoint* do ciclo celular, na progressão do ciclo celular e na cancerigénese (Lange, 2002). O papel dos centrossomas na cancerigénese será desenvolvido posteriormente (ver secção III.2 “Centrossomas e cancro”).

1.4.2 Ciclo de duplicação dos centrossomas

Em situações normais, o ciclo de duplicação do centrossoma ocorre em multi-passos coordenados com o progresso do ciclo celular. Na figura 1.3 encontra-se um esquema que resume as diferentes etapas deste ciclo. Em suma, durante a fase G1 do ciclo celular dá-se a desorientação centriolar que consiste na perda da configuração ortogonal dos centríolos. Depois, ocorre a formação dos procentríolos, os quais vão crescendo progressivamente apresentando o seu comprimento final na mitose. Finalmente, dá-se a maturação do centrossoma que envolve a aquisição do PCM. Após o ciclo de duplicação centrossomal, cada centrossoma é formado por um centríolo mais antigo, o centríolo mãe, e um mais novo recém-formado, o centríolo filho (Debec *et al*, 2010; Lange, 2002; Bettencourt-Dias & Glover, 2007).

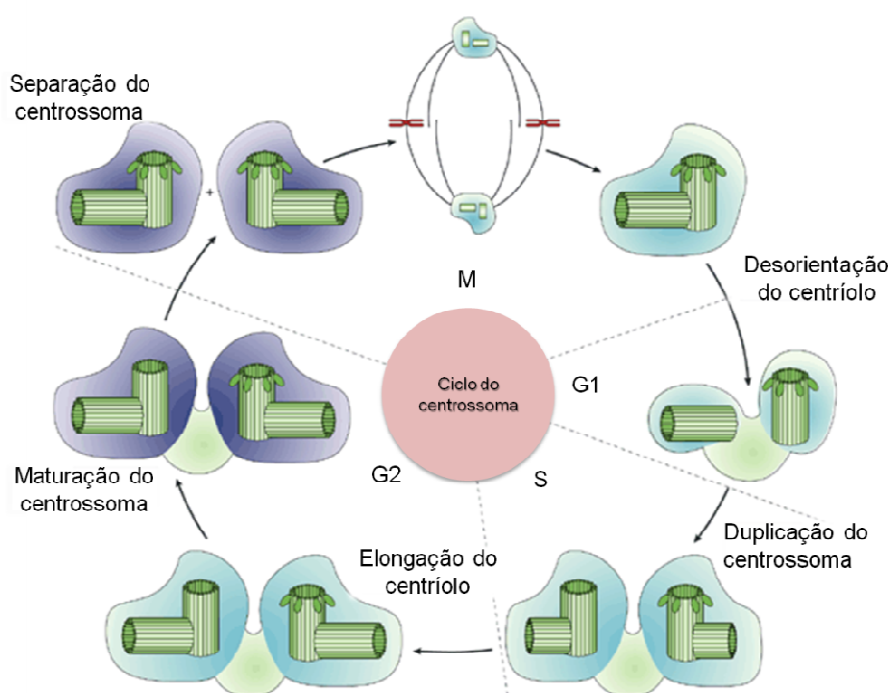


Figura 1.3: **Ciclo de duplicação do centrossoma.** Representação esquemática e simplificada do ciclo de duplicação do centrossoma em células animais. Os centríolos, representados a verde, encontram-se rodeados por um material pericentriolar, a roxo (PCM). O ciclo do centrossoma é temporalmente relacionável e dependente do ciclo celular (Lange, 2002), a sua duplicação pode ser dividida em acontecimentos discretos ao longo do ciclo celular.

M: Aquando da entrada para a mitose ocorre a separação dos centrossomas e estes migram para pólos opostos do núcleo participando na formação do fuso mitótico. Durante a mitose, os centrossomas, presentes em cada pólo, contém um par de centríolos orientados ortogonalmente. G1: Na fase G1 do ciclo ocorre o afastamento dos dois centríolos (mãe e filho) pelo que estes passam a ter uma orientação ortogonal relaxada. S: É na fase S que ocorre propriamente a duplicação do centrossoma. O processo de duplicação dos centríolos é iniciado pela formação de novos centríolos na parede dos centríolos pré-existent, num processo semi-conservativo. Os pró-centríolos formados alongam desta até ao final da fase G2. G2/M: Durante a passagem da fase G2 para a mitose dá-se a maturação dos centrossomas, a qual envolve alterações bioquímicas do material pericentriolar adicional, como o recrutamento de mais proteína γ -tubulina. Assim, no final da fase G2 existem dois pares de centríolos correspondentes aos centrossomas duplicados, os quais participam na organização do fuso mitótico (Adaptado de Nigg, 2002).

I.5 Via de *folding* da tubulina

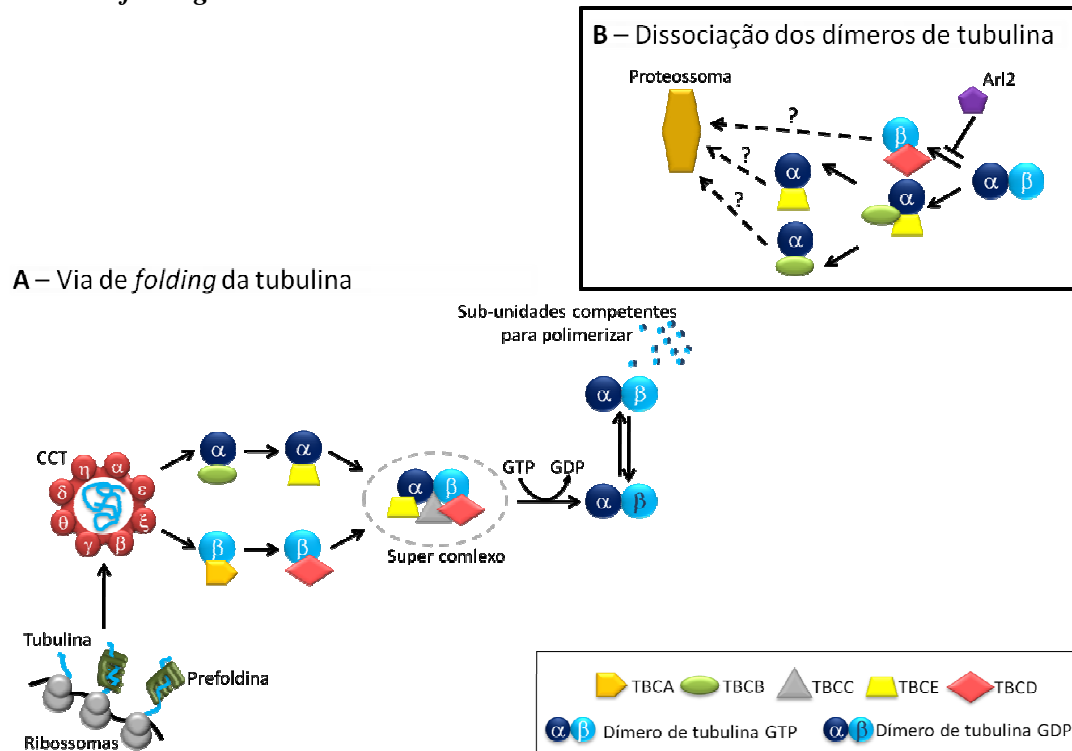


Figura I.4: **Via de *folding* da tubulina.** (A) Esquema representativo do sentido directo da via de *folding* da tubulina. Durante a síntese da tubulina (α - ou β -tubulina) o complexo prefoldina (PFD) interage com as cadeias recém sintetizadas e direcciona-as para a chaperonina citosólica (CCT). Após o CCT assistir no seu *folding* são libertados intermediários de *folding* *quasi*-nativos de α - e β -tubulina, as quais seguem vias distintas ao interagirem respectivamente com o cofactor B (TBCB) e A (TBCE). De seguida, os monómeros interagem com o cofactor E (TBCE) e D (TBCD), respectivamente. Estas vias voltam a convergir pela interacção destes com o cofactor C (TBCC) formando o supercomplexo. Neste, pela interacção do cofactor D com o cofactor C, dá-se a hidrólise de GTP da β -tubulina libertando-se o heterodímero α - e β -tubulina. Após a troca de GDP por GTP no local de ligação ao GTP da β -tubulina o heterodímero α - e β -tubulina passam a ser uma subunidade competente para polimerizar e formar microtúbulos (revisto em Lopez-Fanarraga *et al*, 2001; Szymanski, 2002). (B) A via de *folding* da tubulina pode-se dar no sentido inverso. Os heterodímeros nativos α - e β -tubulina após despolimerização dos microtúbulos podem ser dissociados em α - e β -tubulina pela interacção com o cofactor E (TBCE) e B (TBCB) ou pela interacção com o cofactor D (TBCD), respectivamente (Kortazar *et al*, 2006; Bhamidipati *et al*, 2000). A dissociação do monómero de β -tubulina é dependente da proteína Arl2, *ADP ribosylation factor-like protein 2*, um GTPase (Bhamidipati *et al*, 2000). Os monómeros de α - e β -tubulina dissociados podem assim os serem reciclagem através do supercomplexo ou degradados no caso se encontrarem danificados. Adaptado de Lopez-Fanarraga *et al*, 2001.

A via de *folding* da tubulina é o processo pelo qual o heterodímero de α - e β -tubulina adquire a estrutura tridimensional funcional e é mediada por chaperones e cofactores proteicos (TBCs), finamente regulados (revisto em Lopez-Fanarraga *et al*, 2001), ver figura I.4.

Durante a síntese das tubulinas a partir do ribossoma, as cadeias nascentes de α - e de β -tubulina interagem através de interacções não covalentes com o complexo prefoldina (PFD). Cada tubulina recém-sintetizada, e associada à prefoldina, é entregue à chaperonina citosólica (*cytosolic-chaperonin-containing TCP1* - CCT). O CCT é um complexo hetero-oligomérico formado por dois anéis sobrepostos cada um dos quais com 8 subunidades diferentes (CCT α a

CCT θ) que estabiliza os intermediários de *folding* de tubulina numa conformação quasi-nativa (Llorca *et al*, 2000).

De um modo dependente da hidrólise de ATP (Tian *et al*, 1995; Lopez-Fanarraga *et al*, 2001), o CCT liberta as tubulinas num estado intermédio de *folding* para vias divergentes (Tian, *et al*, 1995); a α -tubulina é capturada pelo cofactor B (TBCB), enquanto a β -tubulina estabelece ligação com o cofactor A (TBCA). De seguida, interagem com o cofactor E (TBCE) e cofactor D (TBCD), respectivamente (Tian *et al*, 1997). Depois, ambas as vias convergem pela junção dos heterodímeros TBCE/ α -tubulina e o TBCD/ β -tubulina ao cofactor C (TBCC) formando-se um supercomplexo. A interacção do TBCC com o complexo promove a hidrólise do GTP pela β -tubulina e a ligação entre os dois monómeros de tubulinas, libertando-se o heterodímero α - e β -tubulina nativo na forma GDP. Atendendo que os heterodímeros ligados a GDP tendem a desagregar-se e que os ligados a GTP tendem a polimerizar-se em microtúbulos, o heterodímero α - e β -tubulina terá que retomar o seu estado de GTP para polimerizar.

A via de *folding* da tubulina pode-se dar no sentido inverso, isto é, pode ocorrer a dissociação do heterodímero pelos cofactores, ver figura I.4. O cofactor B e o cofactor E podem formar um complexo ternário ao capturar a α -tubulina, após dissociação do heterodímero, sendo a β -tubulina recuperada pelo cofactor A (Kortazar *et al*, 2007; Nolasco *et al*, 2005). Depois, os monómeros dissociados podem sofrer reciclagem através do supercomplexo ou serem degradados. A proteína Arl2 (*ADP ribosylation factor-like protein 2*, um GTPase) previne especificamente a dissociação do heterodímero de tubulina e consequente despolimerização dos microtúbulos através da sua interacção com o cofactor D (Bhamidipati *et al*, 2000). Embora o cofactor D e Arl2 formem um complexo ternário com a PP2A (*protein phosphatase 2A*) ainda não se conhece o envolvimento deste fosfatase na via de folding (Shern *et al*, 2003).

I.6 Cofactores da tubulina

Os cofactores de tubulina (TBCs) desempenham papéis fulcrais na via de aquisição da estrutura trimendional do dímero de tubulina. Embora descritos inicialmente como participantes na via de *folding* da tubulina, estudos recentes mostram que os cofactores terão outras funções *in vivo*.



Figura I.5: **TBCA**. Representação esquemática do cofactor A humano Adaptado de Gonçalves, 2010.

O primeiro cofactor a ser identificado na via de *folding* da tubulina foi o **cofactor A** tendo sido denominado por p14 (Campo *et al*, 1994), figura I.5. Este chaperone para além de ligar à

β -tubulina na sua forma *quasi*-nativa (Campo *et al*, 1994) é capaz de libertar a β -tubulina do heterodímero na presença dos cofactores B e E (Llosa *et al*, 1996; Nolasco *et al*, 2005). Todavia, em ensaios de *folding* da tubulina *in vitro*, tanto o cofactor A como o cofactor B, não são essenciais à aquisição da estrutura tridimensional da tubulina, embora a sua presença aumente o rendimento da reacção (Tian *et al*, 1996; Fanarraga *et al*, 1999). Contudo, *in vivo*, o silenciamento do gene *tbca* por RNAi, em células humanas HeLa e MCF-7, conduz a uma paragem do ciclo celular em G1, a modificações na estrutura dos microtúbulos e posteriormente à morte celular (Nolasco *et al*, 2005). Por oposição, a deleção do gene homólogo ao cofactor A em levedura *S. cerevisiae*, o gene *rbl2*, não é letal. Porém, a RBL2 tal como o cofactor A em células de mamífero, é capaz de reverter a letalidade da sobre-expressão de β -tubulina (Archer *et al*, 1995). Estes fenótipos levam à implicação do cofactor A noutras funções para além das já conhecidas na via de *folding*.

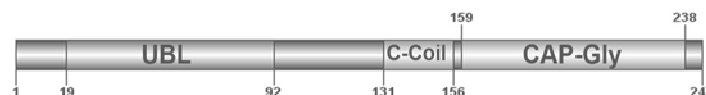


Figura I.6: **TBCB**. Representação esquemática dos domínios funcionais do cofactor B humano: UBL - *ubiquitin-like*, C-Coil - domínio *coiled-coil*, e o domínio CAP-Gly (Grynberg *et al*, 2003). O domínio *coiled-coil* foi relacionado com a degradação via proteossoma (Fanelli *et al*, 2004), o domínio CAP-Gly não interage com os microtúbulos (Kortazar *et al*, 2007). Adaptado de Gonçalves, 2010.

O **cofactor B**, ver figura I.6, foi identificado por Cowan e seus colaboradores como participante na via de *folding* da α -tubulina (Tian *et al*, 1997), ver figura I.4. Este também coopera na dissociação de dímeros nativos de tubulina, como descrito anteriormente (Kortazar *et al*, 2007). Quando o cofactor B é sobre-expresso, em células de mamífero, conduz à despolimerização dos microtúbulos (Kortazar *et al*, 2007) e ao aumento do número de γ -tubulina no centrossoma, um fenótipo semelhante à sobre-expressão de Pak1 (*p21-activated kinase 1*) (Vadlamudi *et al*, 2005; Rayala *et al*, 2007). O Pak1 é um cinase serina/treonina específico que participa na regulação da dinâmica dos microtúbulos, nomeadamente na recuperação destes pós despolimerização com nocodazole. Através de um *yeast two-hybrid screen* observou-se que o cofactor B interage com o Pak1, e que este é capaz de fosforilar o cofactor B (Vadlamudi *et al*, 2005). Observou-se igualmente que a sobre-expressão do cofactor B aumenta a actividade do Pak1 e conduz a uma amplificação do número de centrossomas. O aumento do número de centrossomas traduz-se num aumento de instabilidade genética assim, o cofactor B poderá estar implicado no normal funcionamento da célula e, a sua desregulação na cancerigénese (Vadlamudi *et al*, 2005). Um estudo realizado em axónios mostrou que o cofactor B se localiza no cílio primário, podendo também desempenhar funções nesse organelo uma vez que, quando o seu gene foi silenciado se observou um aumento do tamanho dos axónios (Lopez-Fanarraga *et al*, 2007).

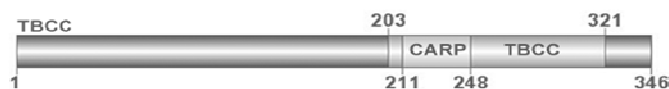


Figura I.7: **TBCC**. Representação esquemática dos domínios funcionais presentes do cofactor C humano: CARP e TBCC. O domínio CARP está presente em proteínas CAP as quais se ligam à G-actina e regulam a sua polimerização (Bertling *et al*, 2004). Adaptado de Gonçalves *et al*, 2010.

O **cofactor C**, ver figura I.7, também identificado por Cowan e seus colaboradores, é crucial para o correcto *folding* da tubulina, uma vez que a sua actividade de GAP (*GTPase activating protein*) é essencial à hidrólise do GTP pela β -tubulina, a qual precede a libertação do heterodímero de tubulina a partir do supercomplexo. (Tian *et al*, 1996; Tian, *et al*, 1999).

Sabe-se que ocorre um aumento de intensidade da marcação do cofactor C por imunofluorescência indirecta quando a célula entra em mitose e durante a sua progressão (Hage-Sleiman *et al*, 2010). Curiosamente, a sobre-expressão do cofactor C em células MCF-7 mostrou um aumento da percentagem de células na fase G2-M do ciclo celular, devido à mitose ser mais lenta. Além disso, observou-se que esta conduz a um aumento do Arl2 e do cofactor D (Hage-Sleiman, *et al*, 2010), os quais interagem regulando a dissociação do heterodímero de tubulina, como referido anteriormente. Estes autores mostraram ainda que a sobre-expressão deste cofactor também influencia a rede de microtúbulos, uma vez que aumenta a quantidade de monómeros não polimerizados, assim como a fracção de β -tubulina e α -tubulina acetilada (Hage-Sleiman *et al*, 2010). A expressão aumentada causa ainda uma hiper-sensibilidade a agentes anti-microtúbulos. Este fenótipo de sensibilidade foi igualmente observado na deleção do gene *cin2*, o seu homólogo em *S. cerevisiae* (Stearns *et al*, 1990).



Figura I.8: **TBCCD**. Representação esquemática dos domínios funcionais presentes no cofactor TBCCD humano: Armadillo e Heat. Estes domínios estão tipicamente envolvidos em interações proteína-proteína (Grynberg *et al*, 2003). Adaptado de Gonçalves, 2010.

Aquando da identificação do cofactor C foi também identificado o **cofactor D** (Tian *et al*, 1996; Tian *et al*, 1997). Este é uma proteína que interage directamente com a β -tubulina (Zabala & Cowan, 1992) e, em conjunto com o cofactor B é capaz de a capturar do heterodímero (Martin *et al*, 2000). Este facto pode justificar a despolimerização dos microtúbulos pela sobre-expressão do cofactor D (Fanarraga *et al*, 2010), uma vez que este, em células de mamífero, não se liga directamente aos microtúbulos (Martin *et al*, 2000).

O cofactor D, ver figura I.8, foi recentemente identificado no centróssoma (Cunningham & Kahn, 2008; Fanarraga *et al*, 2010) em co-localização com o γ -TuRCs em células HeLa em interfase e durante a mitose. Esta proteína é requerida para o recrutamento do γ -TuRC e organização do fuso mitótico de células HeLa (Cunningham & Kahn, 2008). A sobre-expressão do cofactor D humano, a níveis em que os microtúbulos não se encontram despolimerizados,

leva alteração dos níveis de algumas proteínas do γ -TuRCs, nomeadamente à perda da γ -tubulina (Dictenberg *et al*, 1998; Cunningham, & Kahn, 2008). O cofactor encontra-se não só nos centríolos mas também, nos corpos basais, nos cílios primários e no corpo médio do fuso (ou corpo de Fleming, do inglês *midbody*) (Fanarraga *et al*, 2010).

Além disso, em *S. cerevisiae*, o homólogo do cofactor D, a proteína Cinp foi identificada como envolvida na segregação de cromossomas e na estabilidade dos microtúbulos (Stearns *et al*, 1990). Pelo silenciamento do cofactor D observou-se em células de mamífero problemas nos fusos mitóticos, nomeadamente fusos multipolares e monopolares (Cunningham & Kahn, 2008; Fanarraga *et al*, 2010). Deste modo, as funções celulares que o cofactor D desempenha na célula estão longe de serem totalmente compreendidas.



Figura I.9: **TBCE**. Representação esquemática dos domínios funcionais presentes no cofactor TBCE humano: GAP-Gly; LRR e UBL. Os domínios UBL - *ubiquitin-like* e o domínio CAP-Gly são domínios partilhados com o cofactor B. O domínio LRR - *Leucine rich repeats* é um motivo de reconhecimento de proteínas (Grynberg *et al*, 2003). Adaptado de Gonçalves, 2010.

O **cofactor E**, ver figura I.9, foi igualmente descoberto aquando do cofactor C tendo sido descrito como participante na via de *folding* da α -tubulina (Tian *et al*, 1996) mais tarde, foi envolvido na dissociação da β -tubulina do heterodímero (Llosa *et al*, 1996; Nolasco, 2005). Tal como o cofactor D, quando sobre-expresso em células de mamífero, observa-se a despolimerização da rede dos microtúbulos, sendo que após este fenómeno, as subunidades de α - e de β -tubulina não foram detectadas (Bhamidipati *et al*, 2000; Sellin *et al*, 2008). Este resultado sugere que os monómeros terão sido degradados. Esta despolimerização foi mais eficiente aquando da sobre-expressão conjunta do cofactor E e do cofactor B (Kortazar *et al*, 2007).

O silenciamento do homólogo do cofactor E por RNAi em *Drosophila melanogaster* conduz à diminuição da densidade de microtúbulos e induz defeitos dramáticos nos axónios o que sugere que este é requerido para o crescimento axonal em *Drosophila* (Jin *et al*, 2009). Além disso este estudo sugere ainda que o cofactor E desempenha um importante papel ao nível das sinapses. De facto, mutações no gene do cofactor E estão associadas a um grupo de doenças neurodegenerativas raras e congénitas, caracterizadas por hipoparatiroidismo, retardação mental e dismorfismo facial, como o síndrome Sanjad-Sakati (Kortazar *et al*, 2007; Lewis & Cowan, 2002).

I.7 Proteínas relacionadas com os cofactores

I.7.1 E-like, uma proteína relacionada com o cofactor E

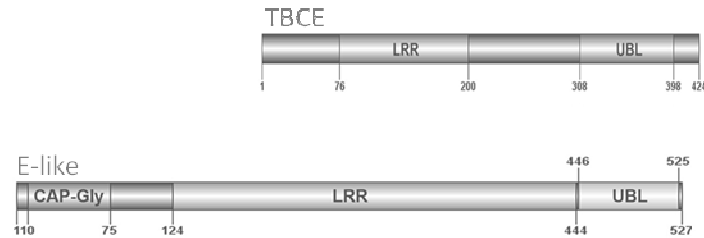


Figura I.10: **E-like – proteína relacionada com o cofactor E** (em cima). A proteína E-like humana (em baixo) partilha os domínios LRR - *Leucine rich repeats* e o domínio UBL - *ubiquitin-like* com o cofactor E humano (Bartolini *et al*, 2005). Adaptado de Gonçalves, 2010.

Cowan e seus colaboradores identificaram uma proteína com sequência semelhante ao cofactor E tendo sido denominada **E-like**. Esta proteína partilha com o cofactor E os domínios *leucine-rich repeats* (LRR) e *ubiquitin-like domain* (UBL), ver figura I.10. O papel destes domínios na função do cofactor E ainda não é conhecido, porém o LRR está envolvido na associação entre proteínas (Bartolini *et al*, 2005). Pela comparação da sequência de proteínas não se detectaram proteínas com uma similaridade significativa ao E-like humano no genoma de plantas, fungos e organismo unicelulares. Porém, esta semelhança foi detectada entre o *E-like* de mamífero e o de *Drosophila*, o que sugere que esta proteína terá uma função específica e apenas exigida nestes organismos (Bartolini *et al.*, 2005). Ensaio *in vitro* mostraram que o *E-like* não consegue substituir o cofactor E nas reacções de *folding* da tubulina. Contudo, a sobre-expressão deste, tal como do cofactor E, em células de mamífero despolimeriza os microtúbulos (Tian *et al*, 2006; Sellin *et al*, 2008). Os elevados níveis de *E-like* causam a rápida degradação das subunidades não polimerizadas (Sellin *et al*, 2008) e levam à desorganização do Complexo de Golgi (Bartolini *et al.*, 2005).

I.7.2 Proteínas relacionadas com o cofactor C (TBCC)

Num estudo recente através de uma pesquisa na base de dados do genoma humano com fim a encontrar proteínas relacionadas com os cofactores de tubulina Soares e os seus colaboradores identificaram o TBCCD1 (*TBCC-domain containing protein 1*), uma proteína relacionada com o cofactor C uma vez que partilha os domínios funcionais TBCC e CARP (Gonçalves *et al*, 2010). Para além da proteína TBCCD1, também a RP2 (*Retinitis pigmentosa protein 2*) é uma proteína relacionada com o cofactor C dada a sua homologia nesses domínios (Schwahn *et al*, 1998), ver figura I.11.

O domínio TBCC é formado por 58 aminoácidos e actualmente não lhe está atribuída qualquer função. O motivo CARP, que integra o domínio TBCC é constituído por 40 aminoácidos e está

associado a CAPs (*cyclase-associated proteins*). As CAPs, proteínas altamente conservadas que ligam a monómeros de actina, estão implicadas em inúmeras funções como na sinalização e/ou regulação do citoesqueleto de actina, no tráfico vesicular e no desenvolvimento (Hubberstey & Mottillo, 2002). Estes domínios encontram-se na região N-terminal do cofactor C e da RP2 e na região C-terminal do TBCCD1.

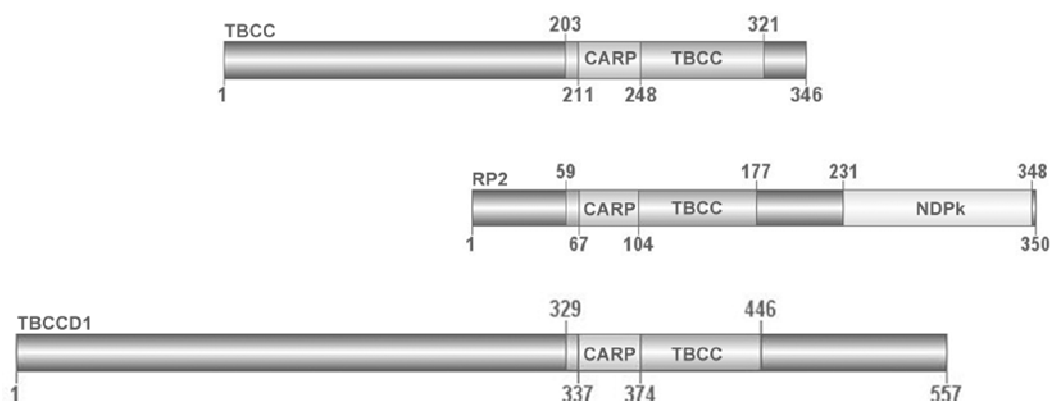


Figura I.11: **Proteínas relacionadas com o cofactor C (TBCC):** RP2 (Retinitis pigmentosa protein 2) e TBCCD1 (TBCC-domain containing protein 1). As proteínas relacionadas com o cofactor C partilham os seus domínios funcionais CARP - cyclase-associated proteins e TBCC (Schwahn et al, 1998; Gonçalves et al, 2010; Gonçalves, 2010; Feldman et al, 2009) Adaptado de Gonçalves *et al*, 2010.

1.7.2.1 Retinitis pigmentosa protein 2 (RP2)

A proteína humana RP2 é expressa de forma ubíqua (Schwahn *et al*, 1998) e possui três domínios funcionais, os domínios TBCC e CARP na região N-terminal e o domínio NDPk (*Nucleoside diphosphate kinase*) na região C-terminal entre os resíduos 235 e 350 (Yoon *et al*, 2006), ver figura I.11. Através de uma análise filogenética, observou-se que a RP2 apenas está presente nos organismos que possuem cílios/flagelos (Stephan *et al*, 2007; Gonçalves, 2010). Esta proteína, em fusão no C-terminal com a proteína fluorescente verde (GFP), foi identificada na membrana plasmática e no citoplasma, sendo que a sua distribuição é variável entre as linhas celulares humanas usadas nos estudos. Por exemplo, no caso das células HeLa esta é predominantemente membranar (Chapple *et al*, 2003; Schwahn *et al*, 2001).

A RP2 possui no domínio N-terminal um motivo de ligação à membrana, o motivo Met-Gly-Cys-X-Phe-Ser-Lys, onde X representa um resíduo de aminoácido qualquer. A ligação à membrana é dependente de uma dupla acetilação (miristoilação e palmitoilação) neste motivo. Sabe-se que se ocorrer uma mutação nos resíduos Gly-Cys, a proteína perde a capacidade de ligação à membrana plasmática (Chapple *et al*, 2002; Schwahn *et al*, 2001).

Mutações no gene *rp2* estão associadas à segunda forma de retinite pigmentosa mais comum, um tipo de cegueira causada pela degeneração grave da retina e ligada ao cromossoma X

(Schwahn *et al*, 1998; Hardcastle *et al*, 1999). A maioria das mutações reportadas são no motivo de ligação da proteína à membrana, ou resultam em proteínas truncadas com a perda do domínio NDPk (Yoon *et al*, 2006) pelo que, a alteração ou a perda da função da proteína levam ao desenvolvimento da retinite pigmentosa associada ao cromossoma X. Assim, a localização da membrana plasmática parece essencial à função da RP2 na retina (Grayson *et al*, 2002).

O domínio NDPk é característico dos enzimas nucleotídeo-difosfato-cinases (NDKs), os quais estão envolvidos na transferência de grupos fosfatos. Alguns destes cinases tem vindo a ser descritos como participantes directos em funções relacionadas com o DNA. Exemplo disso é o NDK2 que está envolvido na regulação da transcrição e o NDK1 que é um 3'→5' exonuclease (Postel *et al*, 1993; Yoon *et al*, 2006). O domínio NDPk da proteína RP2 tem 43% de semelhança com a proteína humana NDK2, contudo não apresenta actividade de NDK (Yoon, *et al*, 2006). Este facto poderá ser explicado pela ausência de um resíduo de histidina crucial para a actividade enzimática (Yoon *et al*, 2006). Por oposição, existe uma sobreposição de funções entre a NDK1 e a RP2 relativamente à actividade de 3'→5' exonuclease (Yoon *et al*, 2006). Os autores verificaram que esta actividade de exonuclease requiere a presença de toda a proteína e não apenas do seu domínio NDPK, a qual é dependente da presença de proteínas necessárias à reparação de excisão de bases (BER). Consequentemente, a RP2 apresenta funções na reparação de danos do DNA.

Uma vez que em células HeLa a proteína RP2 se encontra nas membranas plasmáticas seria de esperar que a exposição a agentes indutores de danos no DNA levasse a uma translocação desta para o núcleo.

De facto, observou-se que a exposição a H₂O₂, por adição *in bolus* de 5 mM e 10 mM durante 20 minutos, conduziam a um aumento da proteína RP2 na fracção que continha as proteínas nucleares em comparação com os extractos obtidos sem qualquer tratamento. Estes resultados são apoiados por microscopia de imunofluorescência, os quais mostram que a RP2 sofre uma translocação da membrana plasmática para o núcleo quando as células são expostas a H₂O₂ (Yoon *et al*, 2006).

A proteína RP2 partilha o domínio TBCC com o cofactor C assim, foi testado se existiria uma partilha de funções entre ambas. Observou-se que tal como o cofactor C, a RP2, *in vitro*, na presença dos cofactores D e E é capaz de estimular a actividade GTPase de tubulina nativa. Porém, esta proteína não é capaz de substituir o cofactor C na via de *folding* da tubulina (Bartolini *et al*, 2002).

De modo a confirmar a partilha de funções entre as duas proteínas procedeu-se a um ensaio de complementação em *S. cerevisiae*. Sabe-se que a deleção do gene homólogo ao cofactor C em levedura, o *cin2*, causa sensibilidade ao benomil e ao frio, agentes destabilizadores dos

microtúbulos (Stearns *et al*, 1990). Assim, foram realizadas experiências de transformação de estirpes de levedura, onde o gene *cin2* tinha sido previamente deletado, com plasmídeos contendo o gene que expressa o cofactor C ou a RP2. Estas experiências mostraram que ambas as proteínas foram capazes de reverter parcialmente a sensibilidade aos agentes anti-microtúbulos acima mencionados o que sugere sobreposição de funções (Bartolini *et al*, 2002).

Como referido anteriormente, o cofactor C possui actividade de GAP (*GTPase activating proteins*), a qual é essencial à hidrólise do GTP pela β -tubulina (Tian *et al*, 1999). Através da análise por homologia entre ambas as proteínas observou-se que a sobreposição de funções se deve, em parte, à presença de uma Arginina, a qual forma deverá formar um dedo de arginina característico das GAP e é crucial à actividade de GAP (Bartolini *et al*, 2002; Evans *et al*, 2010).

Estes estudos mostraram ainda que a proteína RP2 é uma GAP para a Arl3 (*ADP ribosylation factor-like protein 3*). A Arl3 é uma proteína que pertence à família das pequenas GTPases que co-localiza com a β -tubulina nos microtúbulos na retina e no cílio conector (Grayson *et al*, 2002). Quando ocorre a despolimerização dos microtúbulos de células HeLa com nocodazole, observa-se que a Arl3 passa a localizar-se na membrana nuclear (Grayson *et al*, 2002).

Recentemente, a RP2 também foi localizada no cílio conector de células fotoreceptoras, nomeadamente no seu corpo basal e associada aos centríolos da base do cílio. Esta localização é igualmente dependente de miristoilações no N-terminal da proteína (Evans *et al*, 2010).

A RP2 foi igualmente localizada na região peri-centriolar, no complexo de Golgi e em vesículas de transporte entre o complexo de Golgi e a membrana celular. De facto, o silenciamento do gene *rp2* por RNAi promove a fragmentação do complexo de Golgi, um fenótipo semelhante ao observado quando as células são depletadas da proteína Arl3 (Evans *et al*, 2010). A deleção da RP2 e a desregulação da Arl3 resulta na dispersão do mecanismo do transporte vesicular do complexo de Golgi para o corpo basal do cílio, o qual limita a formação/funcionamento deste organelo.

Foi ainda sugerido que a RP2 participa no controlo de qualidade da tubulina no corpo basal do flagelo do *Trypanosoma* (Stephan *et al*, 2007).

Os diferentes estudos mostram que a proteína RP2 deverá desempenhar diferentes papéis celulares exonuclease sensível a agentes indutores de danos no DNA, como o H_2O_2 (Yoon *et al*, 2006) ou na regulação do tráfico vesicular (Evans *et al*, 2010).

1.7.2.1 TBCC-domain containing protein 1 (TBCCD1)

O TBCCD1 foi a última proteína a ser relacionada com o cofactor C, sendo a mesma recentemente caracterizada em células humanas e *Chlamydomonas reinhardtii* (Gonçalves *et al*, 2010; Gonçalves, 2010; Feldman *et al*, 2009).

Através de uma análise filogenética observou-se que a proteína TBCCD1 se encontra na maioria dos organismos analisados neste estudo, porém esta encontra-se ausente em *S. cerevisiae* ou *D. melanogaster* (Gonçalves, 2010).

Uma vez que o TBCCD1 partilha os domínios funcionais TBCC e CARP com o cofactor C e a RP2, figura I.11, foi avaliado o putativo papel desta proteína na via de *folding* da tubulina, nomeadamente a activação da actividade de GTPase da β -tubulina. Para tal, procedeu-se a um ensaio de complementação em *S. cerevisiae* como descrito anteriormente para a proteína RP2 e, observou-se que o TBCCD1 é incapaz de reverter o fenótipo da deleção do gene *cin2*, homólogo do gene do cofactor C. Assim, o TBCCD1 parece não possuir a função de activar GTPases como é o caso do cofactor C e da RP2 (Gonçalves *et al*, 2010).

Este resultado pode ser explicado pelo facto de o resíduo de arginina crucial à actividade de GAP estar ausente no domínio TBCC. Apesar de existir um resíduo de arginina próximo da posição conservada no cofactor C e na RP2 humanos este, não deverá permitir formar a estrutura tridimensional correcta para a formação do dedo de arginina crucial à actividade de GAP (Gonçalves *et al*, 2010; Feldman *et al*, 2009). É de salientar que o resíduo de arginina presente no TBCCD1 não é conservado entre os diferentes organismos, o que apoia a possibilidade de o TBCCD1 não partilhar funções de GAP com o cofactor C (Gonçalves, 2010).

A proteína TBCCD1, através de estudos de microscopia de imunofluorescência e pela expressão de proteínas de fusão com *tags* fluorescentes, foi localizada na matriz pericentriolar do centróssoma, na zona mediana do fuso mitótico, no copo médio do fuso e no corpo basal de cílios primários e motores em diferentes linhas celulares humanas.

A marcação na zona mediana do fuso (ou fuso central) e no corpo médio do fuso apenas foi detectada na linha celular que sobre-expressavam constitutivamente a proteína de fusão TBCCD1-GFP (Gonçalves *et al*, 2010; Gonçalves, 2010).

Curiosamente, sendo o TBCCD1 uma proteína centróssomal a presença de um gene ortólogo na planta *A. thaliana*, um organismo sem centróssomas, sugere que esta possa desempenhar funções que não estão directamente relacionadas com a presença de cílios ou centróssomas (Gonçalves, 2010).

Através da técnica de *live imaging* (microscopia de fluorescência em células vivas) observou-se que a proteína de fusão TBCCD1-GFP se localiza nos pólos do fuso mitótico e na zona mediana do fuso progressivamente à medida que a mitose progride (Gonçalves, 2010).

Estes resultados mostram localizações distintas da proteína TBCCD1 ao longo da mitose, pelo que poderá estar envolvido em funções específicas nesta fase do ciclo.

O TBCCD1 é um componente integral do centrossoma uma vez que a sua localização centrossomal não foi afectada após a despolimerização da rede de microtúbulos por nocodazole (Gonçalves *et al*, 2010).

Sendo esta uma proteína centrossomal, Soares e seus colaboradores foram determinar qual das regiões da proteína eram responsáveis por essa localização. Para tal, a proteína foi dividida ao meio e cada região expressa em fusão com um *tag* fluorescente. Apenas a proteína de fusão que continha a região N-terminal se apresentou no centrossoma, pelo que esta é responsável pela localização do TBCCD1 neste organelo, ver figura I.12. Esta localização centrossomal do TBCCD1 foi igualmente observada na alga verde *C. reinhardtii*, nomeadamente nos centríolos dos corpos basais dos seus dois flagelos e também numa estrutura que liga os dois centríolos ao núcleo, o rizoplasto (Feldman *et al*, 2009).

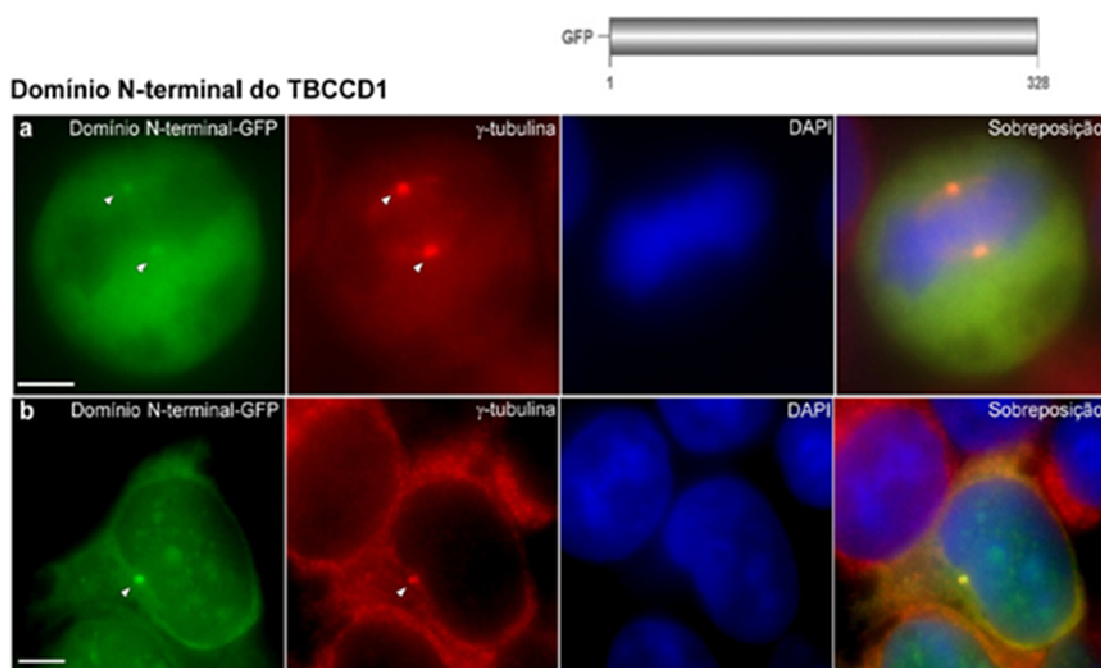


Figura I.11: **O N-terminal da proteína TBCCD1 determina a sua localização centrossomal.** A proteína TBCCD1 foi dividida ao meio e um *tag* fluorescente foi adicionado a cada uma das partes. Apenas nas células transformadas com a metade da célula que continha o N-terminal do TBCCD1 em fusão com GFP, a proteína se localizou no centrossoma durante a **(a)** mitose e **(b)** durante a interfase. As células HEK 293T foram processadas para análise de imunofluorescência indirecta com um anticorpo contra a γ -tubulina e o DNA foi marcado com DAPI. As barras de escala correspondem a 5 μ m (Gonçalves, 2010).

Os estudos realizados envolvendo a proteína TBCCD1 mostraram ainda por *western blot* que a proteína é expressa ubiquamente nas diferentes linhas celulares humanas e em diversos tecidos de murgancho adulto (testículo, cérebro, pulmão, rim e fígado). Neste estudo observou-se ainda que os níveis de TBCCD1 presente nas células hTERT -RPE-1, linha fenotipicamente normal, era muito menor que em linhas celulares provenientes de carcinomas.

Adicionalmente, a expressão de *tbccd1* foi analisada pela técnica de RT-PCR nos tecidos e linhas celulares referidas. Desta avaliação observou-se que o gene *tbccd1* é ubiquamente transcrito sendo que o seu mRNA é mais abundante nos testículos. Estes resultados sugerem a existência de uma regulação pós-transcricional nos diferentes tecidos (Gonçalves, 2010).

De modo a conseguir compreender a função desempenhada pelo TBCCD1 procedeu-se ao silenciamento do gene *tbccd1* pela técnica de RNAi em células hTERT-RPE-1 (Gonçalves *et al*, 2010). Deste estudo pode-se observar que a depleção da proteína TBCCD1 conduz a um aumento do tamanho das células, um atraso do ciclo celular em G1. Detectou-se ainda uma diminuição da eficiência de produção de cílios primários e, através de ensaios de “cicatrização de ferida”, uma migração celular dirigida mais lenta. Para além disso, observou-se um aumento da distância entre o núcleo e o centróssoma, estando o centróssoma frequentemente localizado na periferia da célula.

Um estudo semelhante foi efectuado em *C. reinhardtii* utilizando de células mutantes *asq2*, estas apresentam uma inserção na sequência codificante do gene *tbccd1* e consequentemente não expressam TBCCD1 (Feldman *et al*, 2009).

Neste estudo observou-se igualmente um fenótipo de afastamento do centróssoma em relação ao núcleo, nomeadamente pela perda de ligação entre os centríolos durante a mitose e problemas de posicionamento dos mesmos. Observou-se ainda a presença de um número aberrante de centríolos e um número anormal de flagelos, pelo que o TBCCD1 não afecta a capacidade de os centríolos formar corpos basais (Feldman *et al*, 2009). Embora em células de mamífero apresentem uma diminuição da eficiência de produção de cílios primários, esta poder-se-á dever ao facto de a deleção do TBCCD1 nestas células conduzir ainda a uma desorganização do complexo de Golgi, ver figura I.13, o qual se sabe ser essencial na organização dos cílios (Gonçalves *et al*, 2010).

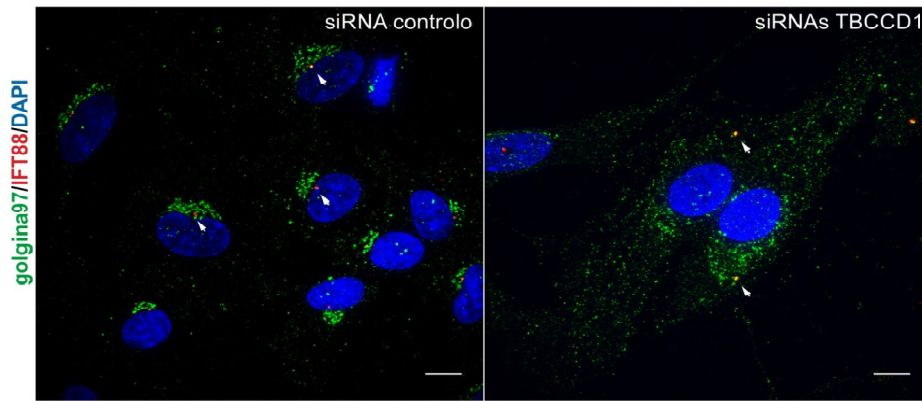


Figura I.13: **O silenciamento do TBCCD1 afecta a organização do complexo de Golgi.** As células hTERT-RPE-1 controlo e as células silenciadas do TBCCD1 (o gene *tbccd1* foi silenciado pela técnica de RNAi) foram processadas para análise de imunofluorescência indirecta com um anticorpo contra o IFT88 e golgina-97, marcadores do centróssoma e do complexo de Golgi, respectivamente. As barras de escala correspondem a 10 μ m (Gonçalves *et al*, 2010; Gonçalves, 2010).

Parte II – Peróxido de Hidrogénio

II.1 Espécies reactivas de oxigénio e stress oxidativo

A presença de dioxigénio (O_2) é um factor essencial à vida em aerobiose. A fosforilação oxidativa é uma das principais formas de produção de ATP nos organismos aeróbios (Thannickal & Fanburg, 2000). Contudo, durante este processo existe a formação de subprodutos activos derivados de O_2 , genericamente denominados por **espécies reactivas de oxigénio (ERO)** (Yu, 1994), cuja acumulação pode comprometer a viabilidade celular.

As ERO podem ser geradas através do metabolismo normal da célula e por exposição externa a diferentes factores como a radiação ionizante, metais pesados ou mesmo pelo aumento da pressão do oxigénio. Estas podem ser moléculas ou radicais sendo as mais comuns o radical anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o radical hidroxilo (HO^{\bullet}), o oxigénio singlete (1O_2) e hidroperóxidos orgânicos (ROOH). As ERO são no geral pequenas moléculas que apresentam electrões de valência desemparelhados podendo por isso ter mais ou menos poder reactivo e causar danos celulares.

Assim, dada a sua toxicidade, o organismo tende a contrabalançar este aumento através da activação do sistema de defesa antioxidantes que contém, quer mecanismos celulares enzimáticos, quer não enzimáticos (Apel & Hirt, 2004).

Quando ocorre o distúrbio do equilíbrio entre oxidantes-antioxidantes a favor dos oxidantes a célula entra em **stress oxidativo** (Sies, 1997), podendo o mesmo ser mais ou menos severo.

As ERO, produzidas em excesso ou perante uma deficiente inactivação, causam danos em proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, como por exemplo a oxidação das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, a peroxidação lípidica e a quebra das cadeias de DNA (revisto em Evans & Halliwell, 1999). Devido a estes danos nas macromoléculas, directa ou indirectamente, as ERO desempenham um papel importante no desenvolvimento de um variado número de doenças, como no cancro, arterioesclerose, diabetes tipo II ou em neuropatologias, mas também durante o estado de inflamação (Rao & Clayton, 2002; Thannickal & Fanburg, 2000).

II.2 Peróxido de hidrogénio (H_2O_2)

II.2.1 Metabolismo do peróxido de hidrogénio (H_2O_2)

Fontes de H_2O_2

O H_2O_2 é a ERO mais abundante nos organismos e microrganismos, sendo continuamente produzido *in vivo* por diferentes fontes como sumarizado na figura I.14.

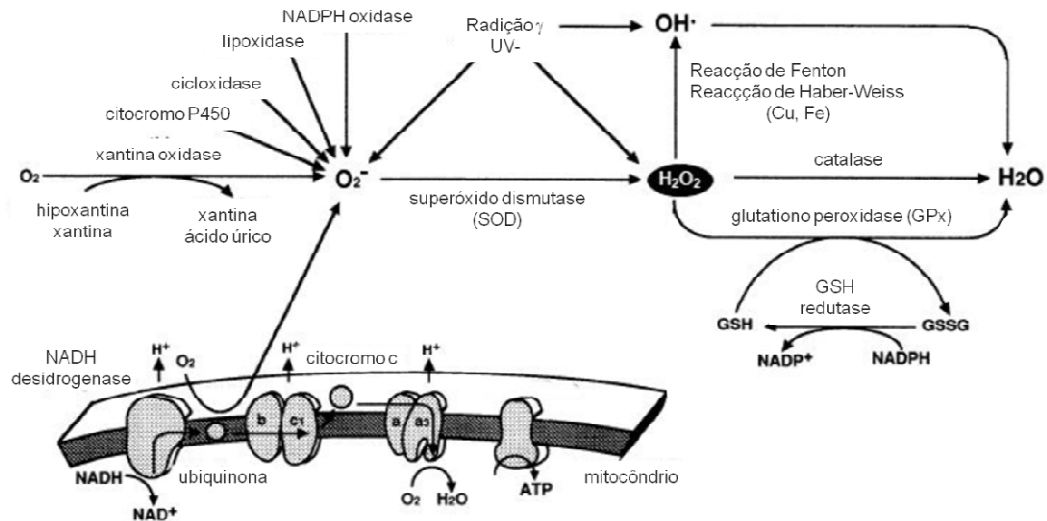
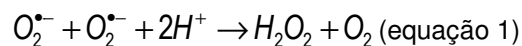


Figura I.14: O H_2O_2 é a ERO continuamente produzido *in vivo*. A maioria do H_2O_2 é produzido pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$ pelo superóxido dismutase. Este é depois consumido principalmente pelo catalase e o glutatona peroxidase (Gpx). O $O_2^{\bullet-}$ é um produto resultante do metabolismo normal, como o transporte de electrões a cadeia respiratória, de diferentes oxidase. Pode ainda ser formado após irradiação γ - ou UV-. O H_2O_2 por sua vez, através de diferentes reacções pode originar outras ERO. Adaptado de Kamata & Hirata, 1999.

A principal fonte de H_2O_2 é a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ catalizada pelo superóxido dismutase (SODs), equação 1:



Todos os oxidases com excepção do citocromo c oxidase são igualmente capazes de produzir H_2O_2 .

Durante a resposta imunitária inata ocorre igualmente a produção de H_2O_2 . O enzima NADPH oxidase que se encontra na membrana plasmática de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos produz o H_2O_2 para o espaço extracelular, o qual é uma espécie neutra capaz de penetrar membrana e por isso, difunde-se localmente contribuindo a inflamação dos tecidos próximos do local de invasão do patogéneo (Oliveira-Marques *et al*, 2007). A radiação, a presença de iões metálicos, como o Ferro ou o Cobre, e as condições de privação de nutrientes *starvation* conduzem também à formação de H_2O_2 .

Remoção do H_2O_2

O H_2O_2 existe *in vivo* num quase estado estacionário pois é relativamente estável e tem um tempo de semi-vida muito superior às restantes ERO (Antunes & Cadenas, 2001; Yu, 1994; Giorgio *et al*, 2007).

Como já referido anteriormente, o H_2O_2 difunde-se pela membrana plasmática sendo decomposto por mecanismos de defesa antioxidantes que incluem enzimas intracelulares como a catalase e o SOD, e pequenas moléculas, como por exemplo o ácido ascórbico e a vitamina E. Os principais enzimas responsáveis pelo consumo de H_2O_2 são a catalase e a glutathione peroxidase (GPx) (Evans & Halliwell, 1999).

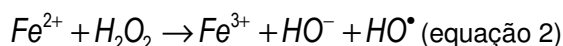
O catalase é um dos primeiros a actuar na remoção do H_2O_2 uma vez que na presença de H_2O_2 é fortemente induzido. Este decompõe o H_2O_2 em H_2O e O_2 . Este encontra-se maioritariamente nos peroxissomas e, em pequena quantidade no citosol em quase todas as células de mamífero. (Antunes & Cadenas, 2001; Imlay, 2008).

O GPx é principal peroxidase envolvido na remoção de H_2O_2 , a sua redução é dependente do glutathione (GSH) de acordo com a reacção cíclica representada na figura I.13. Este enzima não é específico para o H_2O_2 , uma vez que também catalisa hidroperóxidos.

Actualmente, conhecem-se inúmeros isoenzimas GPx que variam nomeadamente de localização celular, estes estão presentes no citosol, a sua maioria, mas também na matriz mitocondrial, no retículo endoplasmático e no núcleo (Oliveira-Marques *et al*, 2009).

II.2.2 H_2O_2 como regulador

Embora o H_2O_2 seja uma ERO pouco reactiva este é capaz de gerar outras ERO com reactividade superior, como o radical hidroxilo (HO^\bullet) e o oxigénio singlete (1O_2). Este na presença de iões de metais de transição, ferro Fe^{2+} ou cobre Cu^+ , pela reacção de Fenton (equação 2), forma o radical hidroxilo (HO^\bullet), uma ERO extremamente reactiva, induzindo assim vários danos nas biomoléculas como a carbonilação de proteínas, a peroxidação lípica e danos do DNA (Imlay, 2008).



Em parte, o grupo heme presente em várias proteínas como a hemoglobina, transferrina, ferritina protege o ferro *in vivo* da reacção de Fenton impedindo a formação de HO^\bullet .

Tipicamente as ERO são vistas como sub-produtos tóxicos do metabolismo que podem provocar lesões em macromoléculas, porém muitos dos processos celulares normais são dependentes do estado redox isto é, do potencial redox celular. Estes processos são regulados por vias de sinalização que permitem controlar a activação ou repressão de genes específicos numa determinada célula e por um período de tempo definido (Quintas *et al*, 2008). A

transdução de sinal é mediada principalmente por fosforilações as quais podem ser controladas por proteínas serina/treoninas cinases ou tirosinas cinases.

Sabe-se que o H_2O_2 intracelular está implicado na regulação de inúmeros processos fisiológicos como a proliferação, o desenvolvimento, a apoptose e a necrose de um modo dependente da sua concentração. Sendo que, a baixas concentrações o H_2O_2 poderá ter um papel regulatório, ver figura I.15 (Antunes & Cadenas, 2001).

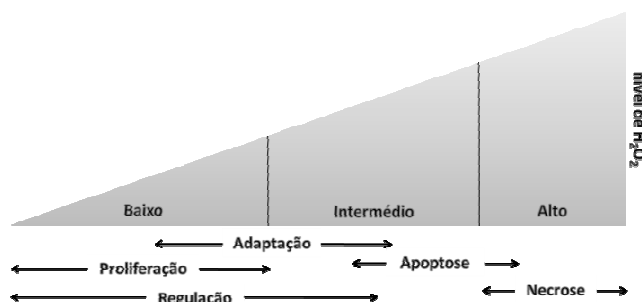


Figura I.15: **Processos celulares dependentes da concentração do H_2O_2 .** O efeito celular do H_2O_2 é determinado pela concentração deste. A baixas concentrações, entre nM e μM , o H_2O_2 desempenha funções na regulação e na proliferação. Doses altas de o H_2O_2 , isto é valores próximos de mM conduzem à activação da necrose.

De facto, o H_2O_2 é um oxidante/redutor fraco e, por conseguinte não oxida a maioria das macromoléculas. Contudo, tem uma grande reactividade com grupos sulfídricos de proteínas, alterando o nível de oxidação dos grupos tióis (revisto em Oliveira-Marques *et al*, 2009, Le Moan *et al*, 2006). Diferentes estudos mostram que o H_2O_2 está envolvido na síntese de DNA, na activação enzimática, na transcrição de genes específicos e na regulação do ciclo celular nomeadamente pela oxidação de resíduos de cisteínas de proteínas envolvidas na transdução de sinal destes processos (revisto em Thannickal & Fanburg, 2000). Deste modo, o H_2O_2 poderá desempenhar, directa ou indirectamente, funções de regulador. O hipotético desencadeamento de uma via de sinalização, ou a sua modulação, ocorre com um aumento temporário das concentrações de H_2O_2 .

II.3 Metodologias de exposição de H_2O_2

Como referido anteriormente o efeito do H_2O_2 na célula é dependente da concentração a que este está presente (ver figura I.15). Deste modo, a concentração de H_2O_2 e a manutenção dos seus níveis na célula aquando da realização dos diferentes estudos é de extrema importância.

II.3.1 *Bolus addition* de H_2O_2

Tipicamente, os estudos do efeito sinalizador do H_2O_2 nas células são realizados por adição *in bolus* deste. Neste método, as células são sujeitas a uma adição única e inicial de uma dada concentração de H_2O_2 , a qual vai decrescendo ao longo do estudo à medida que este é

consumido intracelularmente. Assim, devido ao consumo deste, recorre-se à adição de concentrações elevadas (100 μ M – 1mM) de H_2O_2 durante um dado período de tempo.

Uma vez que a diminuição do H_2O_2 é dependente da sua velocidade de consumo e que esta é variável com o tipo de célula e o número de células presente a cada estudo desconhece-se a concentração específica de H_2O_2 a que cada estudo é realizado e torna-se difícil a comparação entre diferentes estudos (Marques-Oliveira, 2008).

Neste método recorre-se a altas concentrações de H_2O_2 as quais induzem danos oxidativos na célula causados pela alteração da homeostase celular. No caso de se pretender estudar o papel regulatório do H_2O_2 a utilização da adição *in bolus* (*bolus addition*) é desadequada, pois não se sabe se os efeitos observados à *posteriori* são devido ou não às altas concentrações de H_2O_2 a que a célula foi exposta. Esta é uma das principais desvantagens no uso deste método.

II.3.1 Método glucose oxidase

Um método alternativo à adição *in bolus* é a exposição das células a H_2O_2 pela adição de glucose oxidase. Neste método o enzima adicionado produzirá continuamente H_2O_2 pela oxidação da glucose presente no meio de cultura (Marques-Oliveira, 2008), de acordo com a equação 3:



Após adição do glucose oxidase, e devido a efeitos cumulativos, o H_2O_2 vai aumentando ao longo do tempo de exposição. Deste modo, e por oposição ao método anterior, não existe aquando da adição do enzima um distúrbio da homeostase celular pelo que este método é uma melhor opção para o estudo do efeito de H_2O_2 a baixas concentrações.

Este método é igualmente adequado para longos períodos de exposição. Porém, tal como o método a adição *in bolus* desconhece-se a concentração de exposição utilizada impedindo assim a comparação rigorosa entre diferentes estudos.

Deste modo, ambos os métodos representam um modo de exposição de H_2O_2 descalibrado e não controlável (Marques-Oliveira, 2008).

II.3.1 Titulação de H_2O_2 em estado estacionário

Um modo alternativo de expor as células ao H_2O_2 é o método desenvolvido por Antunes e Cadenas que tem por base a criação de um estado estacionário de H_2O_2 (Antunes & Cadenas,

2000), o qual dependente do gradiente de H_2O_2 gerado aquando da exposição das células a uma fonte externa de H_2O_2 .

Como já referido, o H_2O_2 difunde-se através da membrana plasmática, ver figura I.16, sendo decomposto principalmente pelo enzima catalase e glutathione peroxidase (GPx).

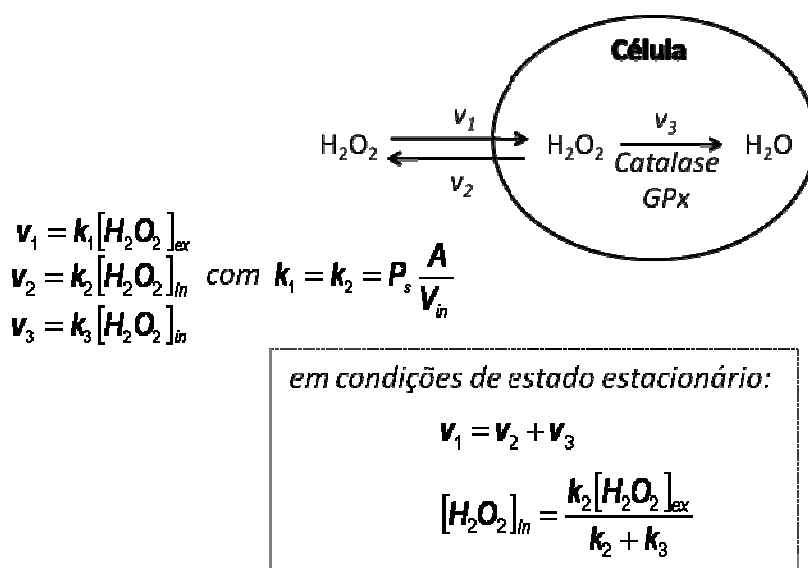
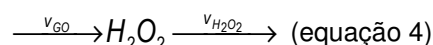


Figura I.16: **Esquema representativo da entrada de H_2O_2 na célula e subsequente consumo intracelular**, onde v_1 é a velocidade de entrada do H_2O_2 e k_1 a respectiva constante de velocidade; v_2 e k_2 são a velocidade e constante de velocidade da saída do H_2O_2 . O consumo de H_2O_2 pelos enzimas catalase e glutathione peroxidase (GPx) encontra-se representada pela v_3 e a sua constante por k_3 . $[H_2O_2]_{in}$ e $[H_2O_2]_{ex}$ correspondem à concentração de H_2O_2 intra e extracelular, respectivamente; P_s – permeabilidade celular; A área da célula; V_{in} – volume intracelular da célula. Adaptado de Antunes & Cadenas, 2000.

Tendo em conta que na maioria dos estudos se considera a velocidade de entrada do H_2O_2 (v_1) igual à de saída (v_2) e mais elevada do que a velocidade de consumo do H_2O_2 (v_3), então, $k_1 = k_2 \gg k_3$ onde em estado estacionário existe uma concentração de H_2O_2 intracelular igual a extracelular. Porém, quando as células são expostas a uma fonte externa de H_2O_2 observa-se um rápido consumo assim, a velocidade de consumo do H_2O_2 (v_3) será igual ou superior à velocidade de entrada do H_2O_2 (v_1) e de saída (v_2) criando-se um gradiente de H_2O_2 . Deste modo, em condições de estado estacionário a concentração intracelular será inferior à extracelular numa razão igual a $\frac{(k_2 + k_3)}{k_2}$, o qual é representativo do gradiente formado (Antunes & Cadenas, 2000). A magnitude do gradiente estabelecido depende então da velocidade de consumo intracelular do H_2O_2 (v_3), a qual difere com o tipo de célula e com o número de células presente a cada estudo. Deste modo, quando se adiciona uma determinada concentração de H_2O_2 às células este é consumido pelos enzimas intracelulares a uma velocidade variável com a densidade celular.

Assim, definidas as condições de estudo como o número de células, é possível através do método de estado estacionário proceder a uma titulação do H_2O_2 constante ao longo do tempo. Este método baseia-se na adição de uma quantidade definida de glucose oxidase a qual irá contrabalançar o consumo intracelular do H_2O_2 criando-se assim um estado estacionário. Para além disso, procede-se ainda a uma adição inicial de H_2O_2 à concentração pretendida garantindo que desde o início do ensaio um valor de exposição de H_2O_2 constante ao longo do tempo.

O estado estacionário de H_2O_2 pode então ser descrito como:



onde v_{GO} diz respeito à velocidade de produção de H_2O_2 pelo glucose oxidase utilizando o glucose presente no meio de cultura. $v_{H_2O_2}$ representa a velocidade de consumo de H_2O_2 intracelular. Considerando que o consumo de H_2O_2 segue uma reacção de primeira ordem tem-se:

$$v_{H_2O_2} = k[H_2O_2] \quad \text{(equação 5)}$$

onde k é a constante de velocidade de consumo de primeira ordem.

De acordo com a equação 4, em estado estacionário temos uma velocidade de produção de H_2O_2 pelo glucose oxidase igual à velocidade de consumo intracelular de H_2O_2 . Deste modo, a concentração de H_2O_2 presente em estado estacionário é dependente do glucose oxidase adicionado e da sua constante de consumo como mostrado na equação 6.

$$-\frac{dH_2O_2}{dt} = 0 \Leftrightarrow v_{GO} = v_{H_2O_2} \Leftrightarrow v_{GO} = k[H_2O_2] \Leftrightarrow [H_2O_2]_{ss} = \frac{v_{GO}}{k} \quad \text{(equação 6)}$$

Este método permite manipular concentrações próximas das condições *in vivo* e determinar com precisão o valor de concentração ao longo do tempo.

Em suma, a titulação de H_2O_2 em estado estacionário é um método adequado ao estudo do H_2O_2 a concentrações fisiológicas.

Parte III – Cancro

O aumento da esperança de vida e o estilo de vida actual levam a que o cancro afecte cada vez mais pessoas no mundo, sendo considerada uma das doenças do século.

O cancro é uma doença genética caracterizada pela capacidade de proliferação autónoma e ilimitada, pela evasão e metastização celular e ainda, por em condições de hipoxia como as observadas nas células tumorais no centro de tumores sólidos conseguir obter ATP (revisto em Tennant *et al*, 2009).

Os vírus, os agentes químicos e físicos, assim como factores genéticos podem alterar o genoma de células somáticas. A acumulação de alterações genéticas levam à activação de proto-oncogenes, à inactivação de genes supressores de tumores e de genes de reparação do DNA que culminam no desenvolvimento tumoral. Muitas das alterações genéticas ocorrem devido à perda da fidelidade do processo de duplicação do material genético (Hartwell & Kastan, 1994). Vários são os estudos que reportam mutações em proteínas que participam no ciclo celular, nomeadamente no controlo da separação dos cromossomas (Tennant *et al*, 2009). Os tumores podem então ser caracterizados por múltiplas aberrações no número e estrutura dos cromossomas e quanto maior o número destas, maior o desenvolvimento tumoral (del Rey *et al*, 2010).

III.1 ERO e cancro

Perante elevados níveis de espécies reactivas de oxigénio (ERO) a célula entra stress oxidativo pois o sistema de defesa antioxidante não é capaz de neutralizar eficazmente estas moléculas (Sies, 1997). Nestas condições, ocorrem danos em diferentes macromoléculas – como proteínas, lípidos e ácidos nucleicos- pelo que as ERO desempenham, directa ou indirectamente, um papel importante no desenvolvimento de inúmeras doenças, como no desenvolvimento do cancro da mama, da próstata e do cólon (Rao & Clayton, 2002; Thannickal & Fanburg, 2000; Acharya *et al*, 2010).

O facto de ERO, como o peróxido (H_2O_2), serem cruciais ao crescimento e sobrevivência celular mas também, à apoptose e necrose leva as ERO a desempenharem um efeito biológico múltiplo e não linear na cancerigénese (Fang *et al*, 2009).

O modelo geral de cancerigénese é um processo complexo que contempla várias mutações de uma célula a favor da sua proliferação. Algumas das células derivadas da progenia desta adquirem uma segunda mutação, potenciando a sua proliferação. A ocorrência de mutações subsequentes, numa ou mais células-filha pode levar ao desenvolvimento do tumor e eventuais metastizações.

As ERO podem ter um papel preponderante no início, progressão e desenvolvimento do tumor (revisto em Acharya *et al*, 2010).

Um exemplo do papel das ERO na cancerigénese é o mecanismo pelo qual o *Helicobacter pylori*, o vírus da hepatite C e do papiloma humano (HPV) funcionam como oncogenes (Fang *et al*, 2009). Durante uma infecção viral, a reacção inflamatória conduz a um aumento de ERO, em especial ao aumento dos níveis de óxido nítrico (NO) e $O_2^{\bullet-}$, os quais podem reagir e gerar um derivado extremamente reactivo (ONOO⁻) que é capaz de infligir mutações e causar danos no DNA. Observou-se que o ONOO⁻ gerado nestas condições fisiológicas induz mutações no *Helicobacter pylori*, tornando-o resistente a diferentes drogas e potencializado o seu papel de oncogene uma vez que as mutações induzidas aumentam a probabilidade desta bactéria alterar o ciclo celular e induzir o desenvolvimento de tumores (Kuwahara *et al*, 2009).

Um outro exemplo representativo do potencial carcinogénico das ERO é a capacidade destas moléculas modularem a expressão de genes envolvidos nomeadamente na proliferação celular.

O receptor de EGF (*epidermal growth factor*) existe na membrana das células e na presença do seu ligando é capaz de activar a proliferação celular por uma cascata de sinalização sensível ao estado redox da célula. O H_2O_2 tem a capacidade de autofosforilar o receptor da membrana mesmo na ausência do seu ligando e por conseguinte activar a cascata de sinalização, ver figura I.17 (revisto em Dröge, 2002).

Perante estados de inflamação longos o H_2O_2 contribui para a activação da via de sinalização dependente do EGF, induzindo a proliferação.

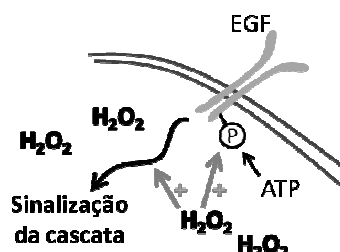


Figura I.17: **Ação do H_2O_2 no receptor EGF.** O H_2O_2 facilita a autofosforilação do receptor de membrana EGF induzindo a cascata de sinalização dependente do receptor EGF. O H_2O_2 promove também a activação da cascata sinalizadora. Adaptado de Dröge, 2002.

Por outro lado, os altos níveis de stress oxidativo levam a uma inibição da proliferação e ao desencadeamento da morte celular por apoptose e/ou necrose. Deste modo, a exposição das células tumorais a um grande stress oxidativo torna-as vulneráveis à morte. Este é o princípio da terapia de oxidação no tratamento do cancro. Muitos dos fármacos anticancerígenos tipicamente utilizados são capazes de gerar ERO levando a célula tumoral a um stress oxidativo a níveis tais que induz a sua morte. Exemplos desses fármacos são a doxorubicina, cisplatina, vinblastina, etc (Fang, *et al*, 2009).

Pelos exemplos apresentados é possível observar uma dualidade de papéis desempenhados pelas ERO no cancro.

III.2 Centrossomas e cancro

A instabilidade cromossomal está associada à aneuploidia (ganho ou perda de material genómico), anormalidades no centrossoma e amplificação genómica. Estas características são muitas vezes utilizadas como marcadores da instabilidade genética de um cancro (del Rey *et al*, 2010; Krämer & Ho, 2001), sendo esta tanto maior quanto o desenvolvimento do tumor (del Rey *et al*, 2010).

Muitos estudos reportam anormalidades na estrutura e número do centrossoma em variadas células tumorais, uma grande maioria é referente a amplificação do número de centrossomas (Nigg, 2002; Krämer & Ho, 2001). Recentemente, observou-se um número crescente de trabalhos com fim a compreender qual a contribuição dos centrossomas na cancerigénese (Nigg, 2006). Isto porque, alterações do centrossoma podem ser causa ou consequência de divisões celulares anormais (Lange, 2002). Além disso alterações no correcto funcionamento do centrossoma conduzem a modificações na polaridade, na forma e migração celular, características que são partilhadas pelas células tumorais (revisto em Nigg, 2006).

Este aumento do número de centrossomas é observado em tumores que apresentam uma expressão aberrante ou supressão de reguladores do ciclo celular – genes do *checkpoint* do ciclo celular, de reparação do DNA- e reguladores do próprio centrossoma (revisto em Saladino *et al*, 2009).

Raff e seus colaboradores mostraram, em *Drosophila*, que o potencial de cancerigénese podia resultar na indução da amplificação dos centrossomas pela sobre-expressão de SAK/PLK4 (Bastos *et al*, 2008). A SAK/PLK4 é um membro da família *polo-like kinase* que é requerido na duplicação dos centríolos em *Drosophila* e células humanas (Bettencourt-Dias *et al*, 2005). Já a favor desta hipótese, Theodor Boveri, há cerca de 100 anos, observou que o aumento do número de centrossomas resultava em fusos mitóticos multipolares e propôs que ocorreria aneuploidia devido à anormal segregação de cromossomas (revisto em Brinkley & Goepfert, 1998).

Foi observado que o inibidor do 3-AB PARP (*3-amino benzamide* (3-AB), a *poly* (ADP-ribose) *polymerase* - PARP) causa a hiperamplificação do centrossoma (Kanai *et al*, 2003). O PARP mantém a integridade genómica uma vez que está envolvido na reparação de quebras numa das cadeias do DNA (SSBs - *DNA single-strand breaks*) e é fortemente activado em tecidos lesionados, onde nestas condições causa a morte celular (Lubbers *et al*, 2010).

A XRCC1 é outra proteína crítica na reparação de SSBs a qual interage com a PARP-1 e está presente no centrossoma ao longo de todo o ciclo celular. Na mitose, esta proteína encontra-se no centrossoma ou na zona adjacente a este, pelo que deverá participar na regulação das funções do centrossoma. O PARP-1, por sua vez, está presente nos centrossomas e nos cromossomas (Okano *et al*, 2005).

Sabe-se que o PARP-1 é activado durante a mitose por agentes que danificam o DNA. Quando as células em metáfase são expostas a H_2O_2 o PARP-1 é sintetizado nos cromossomas metafásicos e o XRCC1 abandona o centróssoma e migra para os cromossomas (Okano *et al*, 2005). Estes resultados sugerem que a reparação de DNA pelos SSBs ocorre com a cromatina condensada nos cromossomas em metáfase. Sugerem ainda que mutações em proteínas centróssomais poderão ser responsáveis por mutações no DNA.

Por outro lado, centróssomas supra-numerários podem resultar de danos do DNA devido a radiação ionizante ou à duplicação do DNA sob stress. Nestes casos, a amplificação do centróssoma parece resultar de danos no DNA.

III.2.1 Amplificação dos centróssomas como resultado de danos no DNA

Uma das formas de infligir mutações no genoma das células somáticas é pela exposição a agentes indutores de danos no DNA como é o caso das ERO e da radiação ionizante.

Como anteriormente descrito, a exposição ao stress oxidativo prolongado está relacionado com o desenvolvimento do cancro.

Tendo por base que células multinucleadas são características de tumores, Cho e seus colaboradores foram observar se a exposição de células Chang (linha celular de hepatócitos humanos) a ERO conduzia a um aumento de instabilidade genómica e consequente amplificação dos centróssomas (Chae *et al*, 2005). Para tal, as células foram sincronizadas e tratadas com 0,1 mM de H_2O_2 durante 8-12 horas. Após o tratamento foram analisar o ciclo celular destas e observaram que as células expostas apresentavam um atraso significativo em G1. Quando as células entraram na fase G2/M foram analisadas por microscopia de imunofluorescência tendo sido observado que as células tratadas (i) continham 3 ou mais centróssomas; (ii) existiam fusos multipolares e (iii) uma separação dos cromossomas multidireccional.

Com o objectivo de correlacionar a amplificação do número de centróssomas e o nível de stress oxidativo os referidos autores avaliaram se esta era dependente ou não do stress oxidativo induzido na célula. Deste modo, utilizaram a adriamicina, um agente quimioterapêutico, que induz um stress oxidativo extremo em células. Na presença deste agente observaram o aumento do número de amplificações do centróssoma. Por oposição, se estas células fossem pré-tratadas com antioxidantes, a geração de células multicentróssomais reduzia significativamente.

De modo a testar se os centróssomas supra-numerários estão relacionados com os danos do DNA, Morrison e seus colaboradores avaliaram o impacto de mutações em genes reparadores do DNA nos centróssomas. Assim, estudaram alterações do número de centróssoma em células de galinha DT40 deficientes no Rad51 (Dodson *et al*, 2004). O Rad51 é um gene

eucariota homólogo do RecA recombinase da *Escherichia coli* essencial para a reparação de danos no DNA. Neste estudo observou-se que a perda de Rad51 conduz a defeitos na reparação dos danos do DNA, a um abrandamento na fase G2/M do ciclo celular e a posterior morte celular. Observou-se ainda que o abrandamento de transição de G2 para a mitose permite a amplificação do número de centrossomas em parte controlado pelo ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*), uma proteína envolvida na sinalização de resposta à exposição a radiação ionizante.

Um outro estudo com objectivos semelhantes, envolvendo a análise do impacto da deleção de outros genes relacionados com os mecanismos de reparação do DNA (DNA-PK, Ku70, H2AX, Xpa e Scc1) (Saladino *et al*, 2009; Bourke *et al*, 2007) mostrou que nenhum dos genes estudados são requeridos para a amplificação dos centrossomas. Deste modo, sugere-se uma independência entre a amplificação dos centrossomas e os mecanismos de reparação do DNA.

Parte IV – Objectivos

Como se pode concluir da leitura da introdução do presente trabalho, poucos são os estudos que estabelecem relações entre o H_2O_2 e os centróssomas (Okano *et al*, 2005; Chae *et al*, 2005). Além disso, os trabalhos existentes envolvem a adição de concentrações muito elevadas (mM) de H_2O_2 .

Neste trabalho pretendeu-se para além de simular as concentrações fisiológicas de H_2O_2 (μM), caracterizar o impacto destas concentrações *in vivo* em duas proteínas centróssomais: o TBCCD1 e a γ -tubulina e consequente efeito para as actividades do centróssoma.

A escolha destas duas proteínas deveu-se ao facto de:

(1) o **TBCCD1** ser uma proteína centróssomal que se encontra relacionada com a RP2 e com o cofactor C. Como referido na introdução deste trabalho, a RP2 tem actividade de 3'→5' exonuclease a qual desempenha funções na reparação de danos do DNA de um modo sensível ao H_2O_2 (Yoon *et al*, 2006). Está igualmente descrito o possível papel do cofactor C como supressor de tumores, uma vez que células do cancro da mama com sobre-expressão de cofactor C ao serem injectadas em ratinhos imunodeficientes apresentaram uma baixa capacidade de crescimento *in vivo* (Hage-Sleiman *et al*, 2010). **Dado o papel de ambas as proteínas relacionadas com o TBCCD1 na cancerigénese, este estudo teve como objectivo avaliar a hipótese de o TBCCD1 participar no desenvolvimento tumoral de um modo dependente do H_2O_2 .**

A hipótese de o TBCCD1 desempenhar um papel na cancerigénese é apoiada pela existência de uma maior quantidade de proteína TBCCD1 em linhas celulares tumorais (HeLa e HEK 293T) do que em linhas fenotipicamente normais (hTERT-RPE-1) (Gonçalves *et al*, 2010) e também pelo facto do gene *tbccd1* ter sido identificado como amplificado no cancro do ovário (Ramakrishna *et al*, 2010).

(2) os microtúbulos devido à sua dinâmica na divisão celular serem um dos maiores alvos para o desenvolvimento de drogas anti-cancerígenas. Na sua maioria, estas drogas procuram suprimir a dinâmica dos microtúbulos pela destabilização ou estabilização destes. Por sua vez, os microtúbulos podem desenvolver mecanismos de resistência às drogas, nomeadamente pela alteração da sua dinâmica (Hage-Sleiman *et al*, 2010).

Sabe-se que altas concentrações de H_2O_2 são capazes de despolimerizar os microtúbulos em células endoteliais da veia do cordão umbilical, HUVEC (Valen *et al*, 1999). O heterodímero de α - e β -tubulina contém 20 resíduos de cisteínas distribuídas heterogeneamente pela estrutura tridimensional (Roychowdhur *et al*, 2000). O H_2O_2 causa alterações na organização da rede de microtúbulos em células MCF-7, mesmo a baixas concentrações (Pedroso, 2003). A γ -tubulina é uma proteína centróssomal chave na nucleação dos microtúbulos envolvida na regulação e dinâmica dos microtúbulos (Raynaud-Messina & Merdes, 2007). Deste modo, **neste trabalho**

teve-se como objectivo estudar a γ -tubulina de modo a avaliar se as alterações da rede de microtúbulos pelo H_2O_2 , acima descritas, estão relacionadas com possíveis alterações na proteína após exposição a baixas concentrações de H_2O_2 .

Com o objectivo de efectuar uma análise comparativa entre células tumorais e células normais utilizaram-se, neste estudo, duas linhas celulares distintas: HeLa e hTERT-RPE-1. A linha celular transformada HeLa provém do adenocarcinoma do epitélio cervical humano, já a hTERT-RPE-1 é uma linha celular do epitélio pigmentado da retina imortalizada pela expressão da proteína telomerase humana.

Em súmula, pela realização deste estudo pretendeu-se:

- (i) estabelecer as condições de trabalho capazes de simular as concentrações fisiológicas de H_2O_2 (μM), recorrendo para tal à exposição do H_2O_2 em estado estacionário.
- (ii) estudar se o H_2O_2 desempenha um papel na regulação do TBCCD1 e se sim de que forma.
- (iii) estudar se o H_2O_2 desempenha um papel na regulação da proteína γ -tubulina e qual o efeito do H_2O_2 a concentrações fisiológicas no centrossoma e na sua capacidade de nuclear e organizar o citoesqueleto de microtúbulos

Capítulo II – Material e Métodos

Parte I – Material e Equipamento

I.1 Linhas celulares

A linha celular transformada HeLa provém do adenocarcinoma do epitélio cervical humano e apresenta um crescimento aderente. A hTERT-RPE-1 é uma linha celular do epitélio pigmentado da retina imortalizada pela expressão da proteína telomerase humana. As linhas hTERT-RPE-1-GFP Clone 10 e hTERT-RPE-1 TBCCD1-GFP Clones 5, 6 e 10 expressam de forma estável a proteína GFP e a proteína TBCCD1 em fusão com GFP, respectivamente. Estas 4 linhas celulares foram produzidas por Gonçalves, J. (Gonçalves, 2010).

Resumidamente, as células hTERT-RPE-1 foram infectadas com partículas virais que continham o plasmídeo recombinante pHR-SIN-GFP ou pHR-SIN-TBCCD1-GFP, respectivamente. Depois, por *cell sorter* isolaram-se células que tinham a sequência gerada da população de células infectada.

As linhas monoclonais hTERT-RPE-1 TBCCD1-GFP Clones 5, 6 e 10 expressam constitutivamente diferentes níveis da proteína TBCCD1, ver figura II.1.

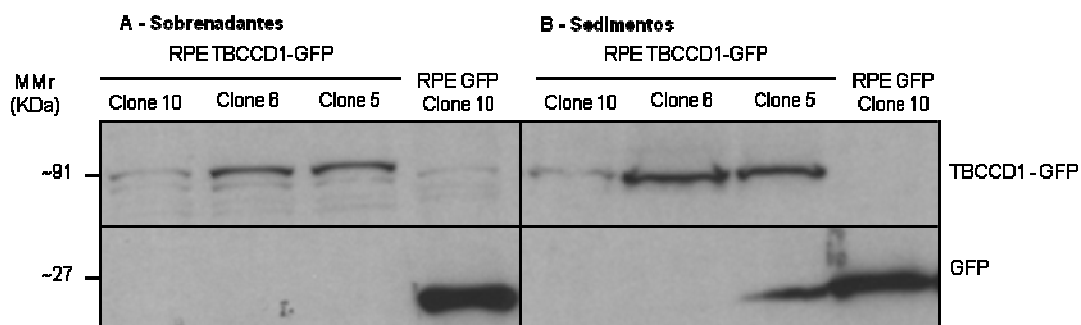


Figura II.1: Níveis das proteínas TBCCD1-GFP e GFP em extractos proteicos desnaturantes solúveis para as fracções sobrenadantes (A) - fracção proteica solúvel- solubilização do sedimentares (B). Após as células serem tripsinizadas procedeu-se à extracção de 1×10^6 células de cada linha celular. Os níveis de proteína apresentados resultam da análise dos extractos por *western blot* com um anticorpo contra a proteína GFP. Quantidade de TBCCD1-GFP por ordem crescente: clone 10, clone 5 e clone 6. Estes resultados foram obtidos por Gonçalves, J.

Doravante, por uma questão de facilidade, as células hTERT-RPE-1 serão designadas somente por RPE-1.

I.2. Reagentes

O meio de cultura RPMI-1640, o soro fetal de bovino (FBS), a glutamina e os antibióticos penicilina e estreptomicina provieram todos da HyClone[®], Thermo scientific. O meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle DMEM/F12 (Ham) (1:1) 1x com Glutamax, os aminoácidos não essenciais, a solução 7,5% de bicarbonato de sódio, a tripsina e a solução tampão fosfato-salino (PBS) 10x para cultura de células de mamífero provieram da GIBCO[™], Invitrogen, assim como o dodecilo sulfato de sódio (SDS). O peróxido de hidrogénio (H₂O₂), o metanol, o etanol, o Tween 20, o NaCl e a glicina foram obtidos na Merck. O glucose oxidase (*Aspergillus Níger*, EC. 1.1.3.4), o catalase (fígado de bovino, EC. 1.11.1.6), o azul de tiazolilo (MTT), o dimetilsulfóxido (DMSO), a digitonina, o Tris-Base, o igepal CA630 (Nonidet-p40), o ditioneitol (DTT), os inibidores de proteases, a albumina do soro bovino para a quantificação proteica (BSA), o Ponceau S, o 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO) e o nocodazole foram adquiridos à Sigma. A ureia adveio da GE Healthcare e o glicerol, a acrilamida, o EDTA da Fluka. O reagente de Bradford proveio da BIORAD[™] e o N,N,N,N-Tetrametiletilenodiamina (TEMED) e persulfato de amónio (PSA) da PROMEGA. A membrana de nitrocelulose (PROTAN 0,45µm) foi obtida na Schleicher & Schuell e o papel de filtro 3MM na Whatman 3MM Chr. Na Kodak foi adquirido as chapas autoradiográficas, o Reagente revelador e Reagente fixador. Utilizou-se o kit de detecção de luminescência da ECL kit Enhanced Chemiluminescence, Amersham: e o kit Immobilon western chemilum hrp substrate da Milipore. A BSA para a imunofluorescência e o meio de montagem MOWIOL 4-88 foram obtidos na Calbiochem[®]. O leite magro desnatado em pó proveio da Molico Nestlé[®]. Os anticorpos utilizados neste estudo foram o Soro anti-TBCCD1 (Gonçalves *et al*, 2010); o Anti-γ-tubulina (Sigma, clone T6557); o Anti-actina (Sigma, clone A5060); o Anti-TBCCD1 (Santa Cruz Biotechnology, poli sc-100179); o Anti-α-tubulina (Sigma, clone DM1A); o Anti-coelho IgG (Zymed, 81-6120 Zy Max); o Anti-murganho IgG1 (Jackson Immuno Research); o Anti-murganho Alexa 488 e 594 (Molecular Probes).

Os *primers* foram todos adquiridos na Sigma, o DNase I na MBI Fermentas GMBH, os enzimas transcriptase reverso superScript II e Taq Polimerase advieram da Invitrogen. O oligo(dT) da Amersham assim como, a mistura de proteínas de massa molecular conhecidos (LMW calibration kit for SDS Electrophoresis). O E.Z.N.A.[®] Kit *Micro-elute* Total RNA Omega proveio da Bioteck.

I.3 Equipamento

Todas as linhas celulares foram manuseadas na câmara de fluxo laminar vertical Danlaf VFRS 1206 e mantidas na estufa de atmosfera húmida com 5% CO₂ Snijders CO190TC-20. Utilizou-se um microscópio de contraste de fase Olympus para observar e contar as células. Na manutenção das culturas de células usou-se ainda um centrífuga de bancada Hettich.

Utilizou-se o espectrofotómetro Camspec M350 Double Beam para as medidas espectrofotométricas e o leitor de microplacas Tecan Sunrise acoplado ao software RdrOle4 para os ensaios de viabilidade celular e quantificação de proteínas.

A quantificação do H₂O₂ foi realizada num eléctrodo de oxigénio (Hansatech Instruments) acoplado ao *software* Oxygraph.

A obtenção de extractos proteicos foi feita utilizando as centrífugas refrigeradas Sigma 202 Mk e 4k10.

A electroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE) foi efectuada nos aparelhos de mini-gel BIORAD Mini-Protean II e a electrotransferência de proteínas através do aparelho de transferência semi-seco (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell Bio-Rad) utilizando uma fonte de tensão Bio Rad PAC200 e Amersham Pharmacia Biotech EPS601, respectivamente.

A imunomarcação das células foi observada no microscópio de fluorescência Leica DRMA2 e no Sistema Deltavision.

O citómetro de fluxo utilizado foi o Coulter Epics Profile II XL2.

Os PCRs foram realizados nos termocicladores Mastercycler Personal (Eppendorf) e Peltier Thermal Cycler – 100 (MJ Research).

A análise dos produtos por PCR foi efectuada recorrendo a um sistema de electroforese de DNA da BIORAD utilizando uma fonte de tensão Bio Rad PAC200. O resultado desta foi observado no transluminador Kodak EDAS 290 e quantificado através do software Image J (NIH).

Parte II- Métodos

II.1 Condições de cultura celular

Utilizou-se o meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS), 2 mM de glutamina e antibióticos (100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina), meio RPMI-1640 completo, para cultivar a linha celular HeLa.

As restantes linhas celulares (RPE-1; RPE-1 GFP Clone 10 e RPE-1 TBCCD1-GFP Clones 5, 6 e 10) foram cultivadas em meio de cultura DMEM/F12 com Glutamax suplementado com aminoácidos não essenciais, 10% (v/v) de FBS, 0,348% (m/v) bicarbonato de sódio, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina. Todas as linhas celulares foram mantidas numa estufa de atmosfera húmida com 5% CO₂ a 37°C.

As células foram mantidas em fase de crescimento exponencial e em monocamadas sub-confluentes. Para tal, as células foram passadas a cada 2-3 dias dependendo da sua confluência. No caso de as células se encontrarem numa confluência inferior a 60-70% apenas se efectuou a substituição do meio de cultura por meio fresco previamente aquecido e equilibrado o seu pH na estufa de atmosfera húmida com 5% CO₂.

II.1.1 Procedimento comum às várias experiências

As linhas celulares utilizadas neste estudo têm um crescimento em monocamada aderentes à superfície da placa/frasco de cultura. Assim, a preparação destas para os diferentes trabalhos laboratoriais foi realizada após as células terem sido tripsinizadas, ou seja quando as mesmas se encontravam em suspensão e aproximadamente 46 horas antes do início da experiência. Este período entre a preparação das células e o início da experiência permite que estas voltem a aderir e à sua forma normal.

Após a tripsinização procedeu-se à contagem das células e estas foram distribuídas pelas diferentes placas de cultura, de acordo com a densidade referida no quadro II.1. A manutenção desta densidade é de extrema importância, uma vez que a obtenção do estado estacionário de H₂O₂, base de todo o trabalho experimental, é dependente da densidade celular presente.

Quadro II.1: **Densidade celular a distribuir pelas placas/frascos de cultura das diferentes linhas celulares utilizadas no presente trabalho.**

Linha celular	Densidade celular/ (10⁶ células/cm²)
HeLa	8,3 · 10⁻³
RPE TBCCD1-GFP Clone 5	5,9 · 10⁻³
RPE TBCCD1-GFP Clone 10	
RPE TBCCD1-GFP Clone 6	
RPE	
RPE GFP Clone10	

No dia da experiência, substituí-se o meio de cultura das células por meio fresco previamente aquecido e equilibrado o seu pH na estufa de atmosfera húmida. Este passo permitiu aproximar as condições iniciais entre as diferentes placas utilizadas a cada ensaio.

II.2 Determinação das condições para o estabelecimento de estado estacionário de H₂O₂

Como referido na introdução do presente trabalho (ver secção II.3.1 “Titulação de H₂O₂ em estado estacionário”), a titulação de H₂O₂ em estado estacionário é o método mais adequado

para expor células ao H_2O_2 em condições semelhantes às observadas *in vivo*, isto porque este permite a adição de concentrações próximas das fisiológicas e a manutenção destas a níveis constantes. Por outro lado, este método permite a determinação e controlo da concentração de H_2O_2 ao longo do tempo.

Atendendo aos objectivos propostos neste estudo optou-se então pelo método de titulação em estado estacionário para se seguir o efeito de concentrações moderadas de H_2O_2 nas diferentes linhas celulares.

O estado estacionário é obtido pela adição de uma concentração de H_2O_2 pretendida, em conjunto com uma determinada quantidade de glucose oxidase ao meio de cultura a qual contrapõe o consumo intracelular do H_2O_2 pelas células, ver equação 4.

Assim, de acordo com a equação anterior, depois de definida a concentração de H_2O_2 e conhecida (i) a constante de velocidade de produção do glucose oxidase (ver secção II.2.2 “Actividade do glucose oxidase (E.C.1.1.3.4)”) e (ii) o consumo intracelular de H_2O_2 pelas células (ver secção II.2.3 “Ensaio de consumo do H_2O_2 em células intactas”) determinou-se a quantidade de enzima necessária a adicionar ao sistema para estabelecer o estado estacionário.

II.2.1 Determinação da concentração de H_2O_2

A determinação da quantidade de H_2O_2 presente em cada ensaio foi obtida através do uso de um eléctrodo de oxigénio.

II.2.1.1 Determinação da curva-padrão

Depois de definida a linha de base do eléctrodo em água destilada, traçou-se a curva padrão com soluções padrões de concentrações conhecidas de H_2O_2 . Estas foram obtidas por diluições em água de uma solução-mãe de H_2O_2 quantificada espectrofotometricamente a 240 nm ($\epsilon_{240\text{nm}}=43,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Para traçar da curva-padrão procedeu-se à adição de 1mL da solução ao eléctrodo e adicionou-se 10 μL de catalase a 1mg/mL, o qual converte rapidamente todo o H_2O_2 presente a solução em O_2 , sendo este detectado pelo eléctrodo.

II.2.1.2 Determinação da concentração de H_2O_2 presente no ensaio

A concentração de H_2O_2 nos diferentes ensaios realizados foi conhecida através do eléctrodo de oxigénio, para isso recolheu-se uma alíquota de 1mL de meio de cultura da placa e adicionou-se 10 μL de catalase a 1mg/mL. Por interpolação da curva-padrão obteve-se a concentração de H_2O_2 presente no ensaio.

II.2.2 Actividade do glucose oxidase (E.C.1.1.3.4)

A determinação da actividade do glucose oxidase (Antunes & Cadenas, 2000) efectuou-se em 10 mL de meio de cultura RPMI-1640 completo aquecido na estufa de atmosfera húmida com 5% CO₂ a 37°C.

O ensaio iniciou-se pela adição de 50 µL de glucose oxidase a 1,060 U/mL, previamente diluído em água, aos 10 mL de meio de cultura. Efectuaram-se leituras dos níveis crescentes de H₂O₂ de 5 em 5 minutos no eléctrodo de oxigénio retirando alíquotas de 1 mL. A primeira leitura foi realizada um minuto após a adição do enzima.

II.2.3 Ensaio de consumo do H₂O₂ em células intactas

Determinou-se a constante de velocidade do consumo 100µM de H₂O₂ pela de leituras dos níveis deste ao longo no tempo no eléctrodo de oxigénio pela adaptação do método descrito em Antunes & Cadenas, 2000.

Procedeu-se à mudança do meio de cultura para meio de cultura RPMI-1640 completo (10 mL de volume numa placa de cultura de 90 mm de diâmetro), fresco e previamente aquecido, uma hora antes do início do ensaio. A reacção iniciou-se com a adição do H₂O₂ e, o consumo deste foi seguido ao longo do tempo, retirando alíquotas de 1 mL, até esgotar a sua presença. No final as células foram tripsinizadas e efectuou-se a sua contagem.

A determinação da velocidade de consumo em células aderentes não é trivial, pois à medida que se retiram alíquotas de meio de cultura para determinar a concentração de H₂O₂ existirá um “maior” número de células para uma “menor” quantidade de H₂O₂ pelo que se observa um maior consumo.

Deste modo, foi necessário efectuar a correcção da constante de velocidade de consumo determinada pela equação 8.

Pressupondo que a decomposição do H₂O₂ se dá segundo uma reacção de primeira ordem tem-se que:

$$-\frac{d[H_2O_2]}{dt} = k[H_2O_2] \text{ (equação 7)}$$

onde k é a constante de velocidade, a qual pode ser determinada pela integração da velocidade de consumo de H₂O₂ (integração da equação 7):

$$\ln[H_2O_2]_f = -kt + \ln[H_2O_2] \text{ (equação 8)}$$

Assim, e tendo em conta a concentração de H₂O₂ inicial, procede-se à multiplicação da constante obtida pelo volume restante sobre o volume inicial do ensaio (10mL) e reutilizando a

equação de velocidade integrada (equação 8) infere-se a quantidade de H_2O_2 que estaria presente caso não houvesse alteração da concentração das células. Por fim, pela representação do logaritmo da concentração de H_2O_2 em função do tempo depreende-se a constante de velocidade de consumo do H_2O_2 pelo declive da recta ajustada aos pontos experimentais.

II.2.4 Determinação da concentração de H_2O_2 em estado estacionário presente no ensaio

Após estabelecido o estado estacionário a manutenção e determinação da concentração de H_2O_2 ao longo do ensaio foi efectuada recorrendo a leituras no eléctrodo de oxigénio como descrito na secção II.2.1 “Determinação da concentração de H_2O_2 ”.

No caso de se efectuarem estados estacionários superiores a 2 horas realizou-se, a meio do ensaio, uma determinação extra da concentração de H_2O_2 , de modo a confirmar se as células se encontravam com a concentração de H_2O_2 pretendida. Se a concentração determinada apresentasse um desvio superior a 15% da concentração desejada, o ensaio era anulado. Nestas leituras, o volume de meio de cultura e a quantidade respectiva de glucose oxidase e H_2O_2 foram imediatamente repostos após a leitura minimizando a variação da concentração de H_2O_2 em estudo.

Com fim a garantir um maior sucesso na manutenção do estado estacionário no dia da experiência, era efectuado um ensaio teste com a concentração de H_2O_2 em estado estacionário à desejada, durante 1 hora. Este ensaio extra permitiu inferir se o estado estacionário era mantido pois, dependendo dos dias, as células apresentavam um consumo ligeiramente variável pelo que a quantidade de glucose oxidase a adicionar tinha de ser ajustada.

O estado estacionário foi estabelecido sempre em meio de cultura RPMI-1640 completo o qual não consome H_2O_2 . A preparação da curva-padrão foi efectuada em água destilada pois, quer as soluções de H_2O_2 a concentrações conhecidas utilizadas sejam preparadas em água destilada, quer em meio, a curva não é alterada.

II.3 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular para determinar a concentração sub-letal de H_2O_2 (concentração de H_2O_2 que após exposição conduz a uma viabilidade superior a 90%) a utilizar no estabelecimento do estado estacionário de H_2O_2 nas linhas celulares RPE-1 e RPE-1 TBCCD1 GFP Clone 5 foi efectuado segundo a adaptação do método de MTT descrito por McGahon *et al*, 1995.

Este método baseia-se no facto de apenas células vivas metabolizarem o azul de tiazolilo (MTT) através de enzimas desidrogenases, nomeadamente desidrogenases mitocondriais, em MTT-formazan, um composto roxo insolúvel em água. Pela solubilização do produto de reacção e respectiva quantificação é inferida a viabilidade celular.

As células foram preparadas 48 horas antes do ensaio em caixas de 6 poços com um volume total de 4 mL de meio de cultura uma densidade celular de acordo com o quadro II.1. Efectuou-se o estado estacionário às concentrações de H_2O_2 desejadas durante os vários tempos pretendidos. Finalizou-se a reacção pela mudança do meio de cultura por 2,5 mL de MTT 5mg/mL preparado em meio de cultura completo. De seguida, incubou-se as células, durante duas horas, na estufa de atmosfera húmida com 5% CO_2 a 37°C. Após este período, removeu-se o meio de cultura com o MTT a 5mg/mL por aspiração e adicionou-se 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada poço.

Depois de garantida uma boa homogeneização dos cristais de MTT-formazan formados, a viabilidade celular foi inferida pela leitura espectrofotometricamente do produto de reacção, MTT-formazan, aos comprimentos de onda de 570 nm e 630 nm para a amostra e referência, respectivamente no leitor de microplacas.

II.4 Ensaio cinético do catalase (E.C. 1.11.1.6)

A constante de velocidade de consumo do H_2O_2 pelo catalase foi determinada seguindo espectrofotometricamente o consumo do H_2O_2 tendo por base o método descrito por Aebi, 1984.

Para tal, incubaram-se células aderentes durante 10 minutos com 2,5 mL em solução tampão de destacamento (0,5 M KH_2PO_4 ; 0,05 M $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1% (m/v) EDTA, pH 7,0). Findo o período de incubação, adicionou-se 1,5 mL de PBS 1× (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na_2HPO_4 ; 1,47 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4) às células. e recolheram-se após o destacamento.

As células foram centrifugadas a 1500 g durante 5 minutos e o sedimento celular lavado duas vezes em PBS. Na última lavagem procedeu-se à recolha das células no mínimo volume possível de PBS, após contagem das mesmas. Estas permaneceram em gelo até ao início do ensaio cinético.

Para determinar a actividade do catalase, adicionou-se sucessivamente à *cuvette* de quartzo, para um volume final de 889 mL, 0,25 milhões de células e digitonina a 1mg/mL. A mistura foi incubada durante 5 minutos a 25°C. Após ter adicionado 10 mM H_2O_2 de modo a perfazer 1mL seguiu-se o seu consumo a 240 nm durante 2 minutos a 25°C. Como branco do ensaio utilizou-se uma solução de 10 mM H_2O_2 preparada em PBS.

II.5 Preparação de extractos proteicos

Os diferentes extractos proteicos foram preparados a partir de aproximadamente 1,5 milhões células para a linha HeLa e 1,7 milhões para as restantes linhas celulares em estudo, sendo este número de células correspondente ao número presente numa placa de cultura de 90 mm de diâmetro.

No caso de se proceder à extracção de proteínas após as células terem sido expostas a uma dada concentração de H_2O_2 em estado estacionário, a confirmação da concentração era efectuada uns minutos antes do tempo de incubação terminar. Findo o período estabelecido, o meio de cultura destas era imediatamente substituído por 600 μ L PBS 1x iniciando-se assim o processo de extracção de proteínas.

II.5.1 Preparação de extractos proteicos totais

Os extractos proteicos totais foram preparados pela adaptação do método descrito em Coelho, 2005.

Para a preparação de extractos proteicos totais aspirou-se o meio de cultura das caixas de cultura e colocou-se as mesmas em gelo. De seguida lavou-se as células duas vezes com PBS e recolheram-se por raspagem em 600 μ L PBS. A suspensão celular obtida foi centrifugada a 5000 g durante 4 minutos a 4 °C e o seu sedimento ressuspendido em 500 μ L de solução tampão A (10mM Tris HCl pH7,5). Este foi centrifugado nas mesmas condições e o sedimento obtido foi ressuspendido em 37,5 μ L de solução tampão A complementado com inibidores de proteases 1x (solução *cocktail* de inibidores de proteases 100X concentrada: aprotinina 20 μ g/ml; benzamidina 10 μ g/ml; pepstatina A 1 μ g/ml; inibidor da tripsina 2 μ g/ml; quimiotripsina 5 μ g/ml). Pela adição de igual volume de solução tampão B (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS (m/v); 10% glicerol (v/v); 250 mM 2-Mercaptoetanol e azul de bromofenol q.b) as células foram lisadas. De seguida, a mistura foi fervida a 94 °C durante 3 minutos promovendo a desnaturação das proteínas.

Esta foi armazenada a – 80 °C até posterior análise.

II.5.2 Preparação de extractos proteicos citosólicos e nucleares

Os extractos de proteínas citosólicas e nucleares foram preparados de acordo com o método descrito em Roebuck *et al*, 1995.

Todo o processo de extracção diferencial de proteínas do núcleo e do citosol foi realizado em gelo e todas as soluções utilizadas no mesmo se encontravam previamente arrefecidas.

Depois de aspirar o meio de cultura das placas de cultura, as células foram lavadas com 600 μ L de PBS. Após adicionar 500 μ L de solução tampão citosólico (50 mM Hepes pH 7,2; 2 mM EDTA; 10 mM NaCl; 250 mM sacarose e 2mM de DTT), as células foram raspadas e recolhidas. A suspensão celular foi centrifugada a 5000 g durante 4 minutos a 4°C. O sedimento obtido foi ressuspenso em 600 μ L de solução tampão citosólico suplementado com 60 μ L de detergente 0,1% (v/v) Nonidet P-40 e 6,6 μ L da mistura de inibidores de proteases. O lisado foi de seguida centrifugado a 3000 g durante 4 minutos a 4°C e recolhido o sobrenadante, correspondente à fracção com as proteínas citosólicas.

O sedimento foi depois ressuspenso em 300 μ L de solução tampão citosólico suplementado com 30 μ L de 0,1% (v/v) NP-40 e 3,3 μ L da mistura de inibidores de proteases e centrifugado nas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 30 μ L de solução tampão de lise nuclear (50 mM Hepes pH 7,2; 2 mM EDTA; 400 mM NaCl; 20% (v/v) glicerol) complementado com 3 μ L de inibidores de proteases. Incubou-se a suspensão em gelo durante 20 minutos, agitando a mesma três vezes, e centrifugou-se a 10 000 g durante 15 minutos a 4°C, recolhendo-se o sobrenadante correspondente à fracção proteica nuclear.

Ambos os extractos obtidos foram armazenados a – 80°C até serem quantificados e analisados por SDS-PAGE.

II.5.3 Preparação de extractos proteicos citosólicos e solubilização do sedimento

Por adaptação do método anterior procedeu-se à preparação de extractos proteicos citosólicos e à solubilização do sedimento obtido, com o fim de maximizar a obtenção das proteínas nucleares e das proteínas ligadas as diferentes membrana celulares.

Assim, a fracção de proteínas citosólicas foi obtida de acordo com o descrito no protocolo anterior (“II.5.2 Preparação de extractos proteicos citosólicos e nucleares”). De seguida, o sedimento obtido na centrifugação foi solubilizado em 30 μ L de uma solução de 8M de ureia preparada de fresco. O sedimento solúvel obtido e os extractos de proteínas citosólicas foram então armazenados a – 80°C até posterior análise. É de salientar que apenas se quantificou a proteína proveniente da fracção citosólica, pois a ureia é um composto interferente na quantificação proteica pelo método de Bradford.

II.6 Western blotting

II.6.1 Determinação da concentração proteica

O doseamento proteico foi feito pelo método de Bradford (Bradford, 1976), tendo como referência a albumina do soro bovino (BSA).

Após efectuar a curva com soluções padrões de concentração conhecida (0,1,2,4,6,8 µg) de BSA diluída em 100µL de água destilada, procedeu-se à diluição das amostras a analisar num volume final de 100µL. No caso das amostras com proteínas citosólicas efectuou-se uma diluição de 1/20, já nos extractos que contém proteínas nucleares a diluição efectuada foi de 1/80. De seguida, a cada solução a analisar, adicionou-se 1 mL de reagente de Bradford.

Transferiu-se 200µL de cada solução anteriormente preparada para uma microplaca e efectuou-se a leitura de absorvência das soluções a 595 nm utilizando o leitor de microplacas.

A determinação da concentração proteica realizou-se sempre imediatamente antes de analisar as amostras em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE).

II.6.2 Electroforese de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturantes (SDS-PAGE)

A separação das proteínas dos extractos preparados foi realizada num gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), de acordo com a técnica de Laemmli (Laemmli, 1970), tendo-se utilizado um gel de resolução de poliacrilamida de 10 ou 12% (v/v) [acrilamida/bisacrilamida; 30:0,8% (m/m)] e um gel concentrador de 5% (v/v), ambos com uma espessura de 1,5 mm. Os géis de resolução e de concentração foram preparados de acordo com o descrito em Sambrook & Russel, 2001.

A partir dos resultados obtidos no doseamento de proteína, ver secção II.6.1 “Determinação da concentração proteica”, analisou-se igual quantidade de proteína para cada conjunto de amostras. Para tal, esta foi normalizada à quantidade máxima de proteína da amostra com menor quantidade face ao conjunto analisado. Tipicamente analisou-se 60µg de proteínas citosólicas e 20 µg de proteínas nucleares. Assim, o volume da quantidade de proteína desejado de cada extracto foi adicionado a um microtubo do tipo eppendorf e completado com água destilada e a solução tampão de amostra para uma concentração final de 0,08 M Tris-HCl, pH 6,8; 1% (m/v) SDS; 5% (v/v) glicerol; 5% (v/v) 2-mercaptoetanol; azul de bromofenol q.b até um volume final de 50 µL. As amostras foram fervidas a 95°C durante cinco minutos imediatamente antes de aplicadas no gel. Por cada gel efectuado foi ainda adicionado 3 µL de uma mistura de proteínas de massa molecular conhecidos (LMW calibration kit for SDS Electrophoresis).

A separação electroforética foi realizada em solução tampão de electroforese (0,025 M Tris base pH 6,3; 0,192 M glicina; 0,1% (p/v) SDS) a 20 mA por cada gel analisado até o azul de bromofenol atingir o final do gel. Terminada a separação electroforética das proteínas em gel de poliacrilamida procedeu-se à electrotransferência destas para a membrana de nitrocelulose.

No caso de se efectuar uma electroforese de proteínas provenientes de extractos totais eram aplicados 25 µL destes directamente no gel após se passar a amostra por uma seringa de 1 mL com uma agulha de 25G. Se a amostra a analisar foi de sedimentos solúveis aplicou-se 15µL

deste e igual volume de solução tampão de amostra após de passar a mistura por uma micro seringa do tipo Hamilton.

II.6.3 Electrotransferência de proteínas para membrana de nitrocelulose

Após a separação das proteínas por electroforese em géis de poliacrilamida procedeu-se à electrotransferência destas para uma membrana de nitrocelulose num aparelho de transferência semi-seco (Bjerrum & Schafer-Nielsen, 1986).

O gel de poliacrilamida e a respectiva membrana de nitrocelulose foram equilibrados, durante 30 minutos, em solução tampão de transferência (48mM Tris, 39mM glicina, 20% (v/v) metanol, 0,0375% (m/v) SDS). Saturaram-se dois conjuntos de seis pedaços de papel de filtro 3MM com a mesma solução e procedeu-se à montagem do sistema semi-seco que compreende o conjunto papel de filtro-gel-membrana-papel de filtro em contacto directo com os eléctrodos, ver figura II.2.

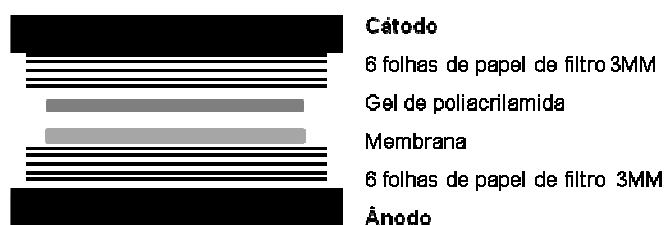


Figura II.2: **Esquema da montagem da transferência de proteínas de um gel de poliacrilamida para uma membrana, num sistema semi-seco.** O sistema de transferência é composto por 6 pedaços de papel de filtro; membrana; gel e outros 6 pedaços de papel de filtro em contacto directo com os eléctrodos como representado.

A electrotransferência das proteínas foi efectuada durante uma hora a uma corrente constante de $0,8 \text{ mA/cm}^2$ de membrana, tendo o cuidado de a voltagem não exceder os 25V.

Através da coloração reversível da membrana de nitrocelulose com uma solução de Ponceau S (0,2 g de Ponceau S; 3 g de ácido tricloroacético; 3 g de ácido sulfosalicílico e água destilada até um volume final de 100mL) avaliou-se o processo da transferência. Depois da coloração, o excesso de corante foi retirado com água destilada. A remoção da totalidade do Ponceau S efectuou-se através de uma lavagem da membrana em PBS durante 10 minutos.

II.6.4 Western blotting

O *western blotting* foi realizado pela adaptação da metodologia descrita em Gershoni & Palade, 1983.

As proteínas imobilizadas na membrana de nitrocelulose foram bloqueadas com 5% (m/v) leite magro desnatado em PBS, solução de bloqueamento, durante uma hora a $\pm 28^\circ\text{C}$ (temperatura ambiente) com agitação orbital. Após o bloqueamento, procedeu-se à incubação da membrana

com o anticorpo primário, previamente diluído em solução de bloqueamento de acordo com o quadro II.2, durante uma hora à temperatura ambiente com agitação orbital. Terminada a incubação a membrana foi lavada três vezes durante 10 minutos em PBS 0,1% (v/v) Tween 20 e incubada, em agitação orbital, com anticorpo secundário ligado à peroxidase de rábano diluído em solução de bloqueamento, de acordo com o quadro II.2, durante uma hora à temperatura ambiente. Finalmente, lavou-se o excesso de anticorpo secundário por incubação da membrana três vezes durante 10 minutos em PBS.

Quadro II.2: **Diluições dos anticorpos primários e secundários utilizadas para a análise por *western blotting***. Estas diluições foram efectuadas em solução de bloqueamento 5% (m/v) leite magro desnatado em PBS 1×.

	Animal em que foi produzido	Diluição efectuada
Anticorpo Primário		
Soro anti-TBCCD1(Gonçalves <i>et al</i> , 2010)	Murganho	1:750
Anti- γ -tubulina (Sigma, clone T6557)	Murganho	1:10 000
Anti-actina (Sigma, clone A5060)	Coelho	1:3000
Anticorpo Secundário		
Anti-coelho IgG (Zymed, 81-6120 Zy Max)	Cabra	1:3000
Anti-murganho IgG1 (Jackson ImmunoResearch)	Cabra	1:3000

A reacção de visualização do antígeno utilizando um substrato quimiluminescente foi realizada recorrendo-se ao *kit Enhanced Chemiluminescence (ECL)* ou ao *kit Immobilon western chemilum hrp substrate*. Para tal, procedeu-se à incubação da membrana com a solução de detecção durante um ou cinco minutos, consoante o kit de detecção de luminescência utilizado. Findo este período a membrana foi exposta a uma chapa autoradiográfica, posteriormente revelada, após o tempos de exposição desejado, com o reagente revelador e o reagente fixador.

O tratamento de resultados das imagens obtidas por *western blotting* foi efectuado utilizando a ferramenta *Threshold* do *software Image J* (NIH).

II.7 Microscopia de Imunofluorescência

A localização das proteínas γ -tubulina e α -tubulina foi realizada por microscopia de imunofluorescência indirecta em células aderentes RPE-1 e HeLa, cultivadas sob lamelas de vidro 48 horas antes do ensaio à densidade descrita em quadro II.1, tendo por base a técnica desenvolvida por Riggs *et al*, 1958.

O meio de cultura foi aspirado e as lamelas com as células lavadas com PBS. De seguida, as células foram fixadas com metanol absoluto frio durante 10 minutos a -20°C e posteriormente lavadas duas vezes, durante 5 minutos, em PBS. Antes do bloqueamento, procedeu-se a uma lavagem rápida com 0,1% (v/v) Tween 20 em PBS. O bloqueamento com 3% (m/v) BSA em

PBS, solução de bloqueio, foi realizado à temperatura ambiente ($\pm 28^{\circ}\text{C}$) em câmara húmida durante 30 minutos. Posteriormente efectuou-se a incubação com o anticorpo primário, previamente diluído em 30 μL solução de bloqueio, durante uma hora à temperatura ambiente. No caso de existirem marcações duplas a incubação de ambos os anticorpos primários foi feita em simultâneo, ver quadro II.3. No final das incubações as lamelas foram lavadas por imersão repetitiva (entrada e saída da lamela nas soluções de lavagem), primeiro numa solução de PBS e depois numa solução 0,1% (v/v) Tween 20 em PBS. Procedeu-se então à incubação com o anticorpo secundário, ver quadro II.3, nas mesmas condições que a incubação com o anticorpo primário e efectuou-se a lavagens das células de acordo com o descrito anteriormente.

A marcação do DNA foi realizada por incubação das células com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole) a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ diluído em PBS, durante um minuto à temperatura ambiente e de seguida, as lamelas foram lavadas abundantemente em PBS.

Procedeu-se então à montagem da lamela sob uma lâmina de vidro com o meio de montagem MOWIOL 4-88 suplementado com 2,5% (m/v) de DABCO (1,4-diazabicyclo [2.2.2]octano).

Quadro II.3: **Diluições dos anticorpos primários e secundários utilizadas para a análise por microscopia imunofluorescente.**

	Animal em que foi produzido	Diluição efectuada
Anticorpo Primário		
Anti- γ -tubulina (Sigma, clone T6557)	Murganho	1:200
Anti- α -tubulina (Sigma, clone DM1A)	Murganho	1:100
Anticorpo Secundário		
Anti-murganho Alexa 488 (Molecular Probes)	Cabra	1:500
Anti-murganho Alexa 594 (Molecular Probes)	Cabra	1:500

O processamento de imagens obtidas da microscopia de imunofluorescência foi efectuado no software *Image J* (NIH).

II.8 Avaliação da capacidade de nucleação por parte do centrossoma em células submetidas a um estado estacionário de H_2O_2

Após um estado estacionário de H_2O_2 , as células foram expostas a nocodazole, um agente despolimerizador dos microtúbulos, de modo a observar se a capacidade de nucleação e ancoramento deste no centrossoma estava afectada, de acordo com o método descrito em Gonçalves *et al*, 2010.

Assim, terminado o estado estacionário, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura RPMI-1640 completo suplementado com 30 μM de nocodazole. Depois, incubaram-se as células durante 40 minutos a 37°C . Terminada esta incubação, as células foram lavadas com PBS frio e de seguida adicionado meio de cultura, pré-aquecido, sem nocodazole. As células foram depois incubadas a 37°C de modo a permitir a repolimerização dos microtúbulos. Procedeu-se à fixação das diferentes amostras após os diferentes tempos de recuperação dos

microtúbulos (0, 5 e 30 minutos), para posterior análise por microscopia de imunofluorescência indirecta, de acordo com o protocolo descrito na secção “II.7 Microscopia de Imunofluorescência”.

II.9 Análise do tamanho celular por citometria de fluxo

As células foram recolhidas por acção do tripsina e centrifugadas a 1500 g durante 5 minutos. O tempo de tripsinização entre as diferentes amostras foi rigorosamente igual. O sedimento obtido foi lavado duas vezes com PBS e centrifugadas nas condições anteriores. Após contagem, 0,5 milhões de células foram ressuspensas em 500µL PBS e analisadas num citómetro de fluxo.

II.10 RT-PCR semi-quantitativo

II.10.1 Electroforese de DNA

A electroforese em géis de agarose por sistema submerso é o método mais usado para separar fragmentos de DNA (Sambrook & Maniatis, 1989).

As electroforeses de DNA realizaram-se em géis de agarose de 1% (p/v) em solução tampão de TAE 1× (40mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,3) com 0,5 µg/mL de brometo de etídio. As amostras foram aplicadas no gel após a adição de uma solução densa de visualização, tendo como concentração final 2,5% (m/v) Ficoll 400, 16mM EDTA pH 8,0; 0,2% (m/v) azul de bromofenol em TAE 1×.

A separação dos fragmentos efectuou-se em solução tampão TAE 1× a 90 V e o resultado da mesma foi visualizado após a linha da frente no gel ter atingido 1/3 do final deste.

II.10.2 Extracção de RNA total de linhas celulares

Procedeu-se à extracção do RNA total de HeLa utilizando o E.Z.N.A.[®] *kit Micro-elute Total RNA* da Omega, de acordo com o protocolo do fornecedor. Este *kit* permite a extracção de RNA a partir de um pequeno número de células utilizando mini-colunas de alta velocidade com matriz reversível. Deste modo, procedeu-se à extracção do RNA das células de uma placa de cultura de 10 mm de diâmetro (\pm 1,5 milhões de células).

Depois de removido o meio de cultura das células e estas lavadas com 1mL de PBS, células foram recolhidas em 1mL de PBS e centrifugadas a 5000 g durante 4 minutos a 4°C. O sedimento celular obtido foi ressuspensado em 350 µL de solução tampão lise fornecida. Após uma centrifugação a 10 000 g durante 2 minutos, adicionou-se ao lisado igual volume de 70%

etanol e aplicou-se a amostra numa coluna *MicroElute*™ RNA. Esta foi centrifugada a 10 000 g durante 15 segundos. Depois de passada para um novo microtubo colector, adicionou-se à coluna 500 µL de solução tampão RWF e centrifugou-se a 10 000 g durante 30 segundos minutos. Finalmente, a coluna foi lavada pela adição da solução tampão de lavagem e centrifugada em iguais condições. O sobrenadante obtido contém o RNA total.

II.10. 3 Síntese de cDNA

A transcrição reversa foi realizada em 5µL de cada amostra de RNA total obtido no passo anterior.

As amostras de RNA foram primeiramente tratadas com DNase I da MBI Fermentas GMBH de acordo com o protocolo do fornecedor. De seguida efectuou-se a síntese de cDNA pela adição do *primer* universal oligo(dT) e do enzima transcriptase reverso superScript II.

II.10.4 Análise da expressão de genes *tbccd1*, *tbcc*, *rp2*, *γ-tubulina* em células submetidas a um estado estacionário de H₂O₂ por PCR semi quantitativo

Pela adaptação da metodologia descrita por Meadus (Meadus, 2003) efectuou-se a análise da expressão dos genes *tbccd1*, *tbcc*, *rp2*, *γ-tubulina* na linha celular HeLa depois de exposta a H₂O₂ em estado estacionário, por um processo semi-quantitativo em relação a um gene controlo.

Neste estudo, utilizou-se como controlo interno o transcrito do gene que codifica para a proteína HPRT, hipoxantina guanina fosforibosil transferase 1. Assim, realizou-se um PCR para amplificar, em condições não saturantes, o transcrito do gene *hpert* de modo a normalizar a quantidade de cDNA a utilizar nos PCRs restantes.

Depois de aferido o volume de cDNA, procedeu-se ainda à optimização do número de ciclos das reacções de amplificação dos transcritos em estudo, utilizando os *primers* apresentados no quadro II.4.

Quadro II.4: Sequência dos *primers* utilizados nas análises de RT-PCR semi-quantitativo.

Gene	Sequências dos <i>primers</i>
<i>hprt</i> (<i>humano</i>)	<i>forward</i> 5'-GGCGTCGTGATTAGTGATG-3' <i>reverse</i> 5'-CATTACAATAGCTCTTCAGTC-3'
Número de acesso: NM_000194	
<i>tbcc</i> (<i>humano</i>)	<i>forward</i> 5'-TGACCGAACTGAGCAAC-3' <i>reverse</i> 5'-CCACTGGATATTTGCTC-3'
Número de acesso: NM_003192.2	
<i>tbccd1</i> (<i>humano e murganho</i>)	<i>forward</i> 5'-CCAGACAGTAACTTTTGCCC-3' <i>reverse</i> 5'-CTCCTTCACAGTTTCTGCC-3'
Números de acesso: NM_018138 e NM_00181368	
<i>rp2</i> (<i>humano</i>)	<i>forward</i> 5'-GCTGTGGTTCAGGACTATG-3' <i>reverse</i> 5'-AGAAGCTGTCTACATCTCCAG-3'
Número de acesso: NG_009107.1	
γ-tubulina (<i>humano</i>)	<i>forward</i> 5' GATCAACCAGCTGGTGTC 3' <i>reverse</i> 5' GTCCTTGAACATGTCCTCC 3'
Número de acesso: NM_001070.4	

O cDNA de cada amostra foi amplificado pela reacção de polimerase em cadeia (PCR) utilizando 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 30 pmol de cada um dos primers e 1U do enzima Taq DNA polimerase, previamente dissolvido num solução tampão específico para um volume final de 25 μ L.

O programa de amplificação utilizado no PCR foi composto por um passo inicial de aquecimento durante 5 minutos a 94°C e seguido por um número fixo de ciclos de desnaturação, hibridação e extensão para cada gene, ver quadro II.5. Cada ciclo é composto respectivamente por 30 segundos a 94°C; 30 segundos à temperatura de hibridação e um minuto a 72°C e a reacção de amplificação finalizada com 72°C durante 10 minutos. A temperatura de hibridação escolhida para o gene *hprt* foi 53 °C, o γ -tubulina foi 55°C e para os restantes genes 58°C.

Quadro II.5: Número de ciclos da reacção de PCR utilizados para amplificar cada cDNA.

Gene	Número de ciclos na reacção de PCR
<i>hprt</i>	28
<i>tbcc</i>	30
<i>tbccd1</i>	31
<i>rp2</i>	32
γ -tubulina	29

A análise dos produtos amplificados por PCR foi efectuada por electrofese de DNA (como descrito em “II.10.1 Electroforese de DNA”) tendo-se para tal aplicado todo o volume reaccional de cada amostra.

A quantidade dos fragmentos amplificados foi estimada através do *software Image J* (NIH).

II.11. Análise estatística

O tratamento estatístico foi efectuado recorrendo ao programa *SigmaStat* versão 3.5.

A comparação de resultados entre dois grupos distintos foi realizada através do teste *t* de *Student* bilateral, assumindo variâncias iguais entre os grupos. Considerou-se um resultado estatisticamente significativo sempre que o valor de $p < 0,05$.

Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão de n experiências independentes.

Capítulo III – Resultados e discussão

Parte I – Optimização das condições de estabelecimento em estado estacionário

A primeira parte do presente estudo incidiu na determinação das condições para o estabelecimento do estado estacionário de H_2O_2 (ver Introdução, secção II.3.1 “Titulação de H_2O_2 em estado estacionário”) nas diferentes linhas celulares em estudo, já que esta constitui a base de todo o trabalho experimental.

Como anteriormente referido, a adição exógena de H_2O_2 às células leva à difusão deste ao longo da membrana. Todavia, esta difusão não é totalmente livre dado que se observa uma concentração de H_2O_2 intra e extracelular distinta. Estas diferentes concentrações implicam a existência de gradiente de H_2O_2 através da membrana plasmática, o qual é dependente do consumo intracelular do H_2O_2 (Antunes & Cadenas, 2000). Assim, a concentração de H_2O_2 em estado estacionário dependerá do gradiente formado e, por conseguinte do consumo intracelular de H_2O_2 . Deste modo, procedeu-se primeiramente à determinação da velocidade de consumo intracelular para se definir a concentração de H_2O_2 em estado estacionário a utilizar nas diferentes linhas celulares de mamífero do presente estudo.

Tendo em conta que se pretende estudar o potencial papel regulador/sinalizador do H_2O_2 nas proteínas TBCCD1 e γ -tubulina, nas linhas celulares HeLa e RPE-1, a escolha do valor de concentração deste deverá ser o mais próximo possível do da concentração de H_2O_2 fisiológica. Devido a limitações experimentais optou-se pela escolha de uma concentração sub-letal de H_2O_2 . Esta é definida como uma concentração de H_2O_2 a que as células depois de expostas, durante um dado período de tempo, apresentam uma viabilidade celular superior a 90 % isto é, uma viabilidade próxima da observada para o controlo. Portanto, embora a uma concentração ligeiramente superior à observada a níveis fisiológicos, é mimetizada a concentração de H_2O_2 *in vivo*, garantindo-se assim uma avaliação do papel do H_2O_2 como regulador celular de algumas vias de sinalização. Na figura III.1 encontra-se representada a zona da gama de concentração de H_2O_2 escolhida para a realização deste trabalho (Oliveira-Marques, 2008).

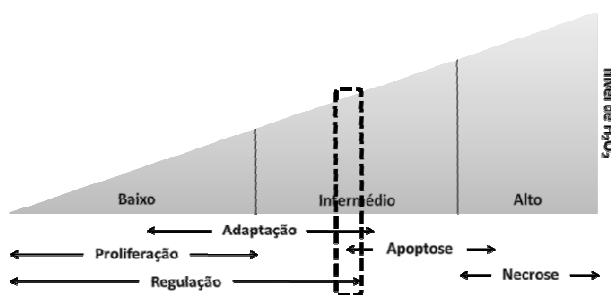


Figura III.1 **Intervalo de concentração de H_2O_2 definido como concentração sub-letal.** Representação dos diferentes processos metabólicos dependentes da concentração de H_2O_2 . A função do H_2O_2 é determinada pela concentração intracelular deste, o qual pode variar entre nM a mM. O rectângulo a tracejado representa um nível em que o H_2O_2 (μM) é capaz de causar alguma apoptose, contudo ainda apresenta funções de regulador celular. Adaptado de Oliveira-Marques, 2008.

I.1 Calibração das condições de estabelecimento do estado estacionário

A exposição constante e controlada ao longo do tempo de H_2O_2 é conseguida pela titulação deste por estado estacionário. Para o seu estabelecimento foi necessário determinar a constante de velocidade de consumo de H_2O_2 pelas células e adicionar uma quantidade tal de glucose oxidase que contrarie o efeito do consumo (ver Introdução, secção II.3.1 “Titulação de H_2O_2 em estado estacionário”). Assim, começou-se por determinar a actividade do enzima e, de seguida o consumo intracelular do H_2O_2 pelas células.

I.1.1 Actividade do glucose oxidase

O glucose oxidase é um oxidorreductase que catalisa a oxidação da glucose em H_2O_2 e gluconolactona. A glucose necessária para esta reacção encontra-se presente no meio de cultura RPMI-1640.

Procedeu-se à determinação da actividade do glucose oxidase de modo a determinar o valor próximo de enzima a adicionar para estabelecer o estado estacionário.

Assumindo que a actividade de glucose oxidase é uma reacção de primeira ordem, pela representação da concentração de H_2O_2 em função do tempo do ensaio determinou-se uma actividade específica de $2,80 \mu mol/min/mg$.

Aquando da realização de cada experiência, a quantidade de glucose oxidase a adicionar no estabelecimento do estado estacionário de H_2O_2 foi sempre ajustada através da realização de um ensaio teste uma vez que, o consumo intracelular de H_2O_2 pelas células nas diferentes experiências é ligeiramente variável.

I.1.2 Consumo de H_2O_2 por células intactas

Tendo em conta as linhas celulares em estudo neste trabalho experimental (HeLa, RPE-1; RPE-1GFP Clone 10 e RPE-1 TBCCD1-GFP Clones 5, 6 e 10) a constante de velocidade de consumo de H_2O_2 foi determinada primeiramente para as células HeLa e de seguida para as diferentes linhas RPE-1.

A- Determinação da constante de velocidade de consumo de H_2O_2 em células HeLa

A constante de velocidade de consumo de H_2O_2 por células HeLa intactas e viáveis foi de $0,064 \pm 0,004 \text{ min}^{-1}/10^6 \text{ células} \times \text{mL}$. O valor determinado diz respeito à média dos valores obtidos em duas experiências independentes, cada uma em duplicado.

B- Determinação da constante de velocidade de consumo de H_2O_2 em células RPE-1

As células RPE-1 foram mantidas em meio de cultura DMEM/F12, o qual consome O_2 (resultados não apresentados) e, por isso, torna impossível a determinação correcta da concentração de H_2O_2 pois o valor deste é deduzido através da utilização de um eléctrodo de dióxigénio. Deste modo, uma hora antes do início do ensaio procedeu-se à mudança do meio de cultura para meio fresco RPMI-1640 mantido a 37°C numa atmosfera húmida com 5% CO_2 , o qual não consome O_2 .

A constante de velocidade de consumo de H_2O_2 em células RPE-1 intactas e viáveis determinada foi de $0,044 \pm 0,004 \text{ min}^{-1}/10^6 \text{ células} \times \text{mL}$. O valor obtido corresponde à média dos valores obtidos em quatro experiências independentes, tendo sido cada uma realizada em duplicado.

Observa-se que o valor da constante de velocidade obtido para esta linha celular é menor que o valor obtido para as células HeLa, o que indica que linhas celulares distintas metabolizam a diferente velocidade o H_2O_2 . É de realçar que esta diferença de metabolismo poderá ser justificada por, apesar de ambas serem linhas de origem epitelial, as células RPE-1 serem imortalizadas pela expressão da proteína telomerase humana e fenotipicamente normais, enquanto as células da linha celular HeLa advirem de um adenocarcinoma.

De facto, aquando da cancerigénese, devido ao processo inflamatório existente ocorre um aumento local da libertação de espécies reactivas de oxigénio, ERO, induzindo as células a um stress oxidativo. O stress oxidativo activa diferentes respostas celulares contra o mesmo (Brown & Bicknell, 2001; Oliveira-Marques *et al*, 2009), como a proliferação de peroxissomas, os quais contêm nomeadamente o catalase e o glutatióno peroxidase, enzimas que metabolizam o H_2O_2 (Yeldandi *et al*, 2000).

A presença de altas concentrações de ERO como o H_2O_2 conduz entre outros, à morte celular, por necrose e apoptose, de algumas células tumorais impedindo assim o progresso da cancerigénese. Porém, devido à capacidade de evasão de algumas células, algumas destas vão sobreviver e proliferar permitindo assim o sucesso da formação de um tumor.

Sabe-se que as células tumorais encontram-se tipicamente associadas a um ambiente de stress oxidativo superior às células não tumorais (revisto em Brown & Bicknell, 2001). Tendo em conta que se observou uma velocidade de consumo intracelular do H_2O_2 superior na linha celular tumoral (HeLa) pode-se depreender que esta capacidade superior de catabolizar o H_2O_2 deve-se a possíveis alterações metabólicas as quais podem ser causa ou efeito, directo ou indirecto, da sobrevivência das células tumorais num ambiente com maior quantidade de ERO, ou seja, na presença de um nível de stress oxidativo superior.

C- Determinação da constante de velocidade de consumo de H_2O_2 em células RPE-1 que sobre-expressam a proteína de fusão TBCCD1-GFP

Procedeu-se à determinação da constante da velocidade de consumo de H_2O_2 em 3 linhas celulares monoclonais RPE-1 TBCCD1-GFP, as quais expressam constitutivamente níveis diferentes da proteína TBCCD1 (ver Material e Métodos, secção I.1 “Linhas celulares”). As experiências foram conduzidas como anteriormente descrito para a linha celular RPE-1.

No quadro III.1 encontram-se os valores das constantes de velocidade de consumo de H_2O_2 determinadas para as diferentes linhas celulares. Pela análise deste, observa-se que a sobre-expressão da proteína TBCCD1 altera o consumo de H_2O_2 para as linhas celulares dos clones 5 e 6 em relação ao controlo (RPE). Este aumento observado não é devido a esta ser uma proteína de fusão com GFP pois o consumo de H_2O_2 para ambos os clones é igualmente superior se se comparar ao consumo obtido para as células RPE GFP Clone 10.

Quadro III.1: **Constantes de velocidade de consumo de H_2O_2 em células intactas.** Os valores dizem respeito a experiências com um n entre 3 e 6, cada uma em duplicado.

Linha celular	$k/(min^{-1}/10^6 \text{ células} \times mL)$	Desvio padrão
RPE TBCCD1-GFP Clone 5	0.060	0.008
RPE TBCCD1-GFP Clone 10	0.036	0.006
RPE TBCCD1-GFP Clone 6	0.052	0.014
RPE	0.044	0.004
RPE GFP Clone 10	0.038	0.002

A análise do quadro anterior revela que a quantidade dos níveis de proteína TBCCD1 nos diferentes clones parece estar directamente correlacionada com a constante de consumo de H_2O_2 obtida, ver figura II.1 e III.2. Porém, apenas a constante de consumo do Clone 5 é significativamente diferente da obtida em RPE-1 e RPE-1 GFP Clone 10.

No caso da constante de consumo do clone 6 e considerando que o aumento da quantidade de proteína é sinónimo do aumento da constante de consumo, seria de esperar que existisse igualmente uma diferença significativa face aos controlos. Contudo, é na linha celular deste clone que a constante de consumo apresenta um desvio padrão maior. Deste modo, para tirar conclusões válidas sobre a relação entre os níveis de expressão da proteína TBCCD1 e a

constante de consumo de H_2O_2 seria necessário realizar um maior número de experiências que permitissem diminuir o desvio padrão.

A determinação da constante de consumo de H_2O_2 em células RPE-1 com o gene *tbccd1* silenciado por RNAi poderia ajudar na compreensão desta possível correlação.

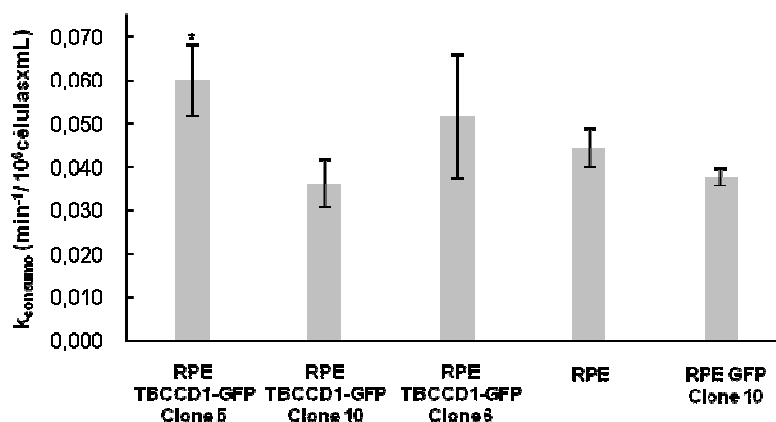


Figura III.2: **Representação das constantes de velocidade de consumo de H_2O_2 por células intactas.** Gráfico representativo das constantes de velocidade de consumo de H_2O_2 em min⁻¹/10⁶ células x mL, determinadas nas diferentes linhas celulares, e o seu respectivo desvio padrão. Análise estatística efectuada usando o *t-test*: * $P = 0,009$ vs. RPE e $P = 0,003$ vs. RPE GFP Clone 10.

Uma vez que se observou somente uma diferença significativa entre a constante de consumo das células RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 5 e os seus controlos, o estudo da sobre-expressão desta proteína prosseguiu-se apenas para esta linha celular, pelo que as condições necessárias para estabelecer o estado estacionário foram unicamente calibradas para este clone.

I.2 Determinação da concentração extracelular de H_2O_2 a usar em estado estacionário

A escolha da concentração de H_2O_2 a usar nos estados estacionários foi determinada por sobrevivência celular. Isto porque, como explicado anteriormente, se uma exposição a uma dada concentração de H_2O_2 levar a uma viabilidade superior a 90% do total das células do ensaio esta é definida como uma concentração sub-letal, sendo esse o valor definido como a concentração a usar nos estudos efectuados em estado estacionário. É de notar que se a concentração extracelular é constante ao longo do tempo espera-se uma diferente morte celular a uma exposição mais ou menos longa, pelo que, além da concentração a usar será igualmente necessário seleccionar o tempo de estado estacionário a que as células são expostas.

De acordo com os estudos efectuados por Oliveira-Marques, V., o valor de concentração de H_2O_2 sub-letal para o estabelecimento do estado estacionário em células HeLa durante 4 horas é de 25 μM . Sendo que, através do gradiente determinado para esta linha celular, ao se expor as células a esta concentração, a concentração intracelular de H_2O_2 é de 3,7 μM (Oliveira-

-Marques, 2003; Oliveira-Marques, 2008). Portanto, escolheu-se este valor de concentração extracelular para se estabelecer o estado estacionário em células HeLa. Através da constante da velocidade de consumo determinada anteriormente (ver secção I.1.2.A “Determinação da constante de velocidade de consumo de H_2O_2 em células HeLa”; $k_{consumo} = 0,064 \pm 0,004 \text{ min}^{-1} / 10^6 \text{ células} \times \text{mL}$) procedeu-se ao cálculo da velocidade de produção de H_2O_2 ($V_{H_2O_2}$) pela seguinte equação 9:

$$V_{H_2O_2} = k_{consumo} [H_2O_2], \text{ em que } [H_2O_2] \text{ é igual a } 25 \mu\text{M de } H_2O_2 \text{ (equação 9)}$$

Pela velocidade de produção de H_2O_2 e, considerando a actividade de glucose oxidase anteriormente determinada infere-se a quantidade de glucose oxidase necessária a adicionar às células a cada ensaio para contrariar o consumo de H_2O_2 garantindo-se deste modo o estado estacionário à concentração desejada.

Uma vez que não se tinha qualquer referência para a escolha do valor de concentração de H_2O_2 para estabelecer o estado estacionário em células RPE-1 efectuou-se um teste preliminar com base na morfologia apresentada quando as células se encontram em apoptose (*blebbing* da membrana) para seleccionar esse valor. Assim, as células RPE-1 foram expostas a diferentes concentrações de H_2O_2 em estado estacionário (*i.e.*, 6; 12,5; 17,5; 25; 35; 50 μM) durante 8 horas e, ao longo desse tempo foram observadas ao microscópio óptico e a concentração de H_2O_2 efectiva em cada ensaio controlada e corrigida se necessário.

Por este ensaio procurou-se escolher uma concentração adequada para efectuar um estado estacionário durante 4 horas nestas células. A escolha deste período de exposição deve-se ao facto de as células HeLa terem o seu estado estacionário optimizado para este tempo, permitindo assim uma comparação temporal do efeito do H_2O_2 nas duas proteínas em estudo em ambas as linhas celulares.

Embora tenha sido difícil a manutenção do estado estacionário ao longo do tempo, as células RPE-1 expostas a 25 μM de H_2O_2 em estado estacionário não apresentaram nenhum fenótipo de apoptose visível ao microscópio até às 4 horas de exposição, pelo que se escolheu este valor como concentração extracelular a utilizar no estabelecimento do estado estacionário para a linha celular RPE-1.

Para avaliar se a exposição desta concentração extracelular durante 4 horas é uma concentração sub-letal procedeu-se à determinação da viabilidade celular das células RPE-1 submetidas a 25 μM de H_2O_2 em estado estacionário utilizando o método de MTT. Pela realização deste, observou-se que as células, nestas condições, apresentavam uma sobrevivência celular muito baixa ($23,2 \pm 3,2 \%$), pelo que esta não é uma boa concentração extracelular a utilizar neste estudo.

Deste modo, determinou-se a sobrevivência das células expostas durante 4 horas em estado estacionário a concentrações continuamente mais baixas, 14, 10 e 5 μM de H_2O_2 . Destas

concentrações, apenas a última concentração pode ser considerada sub-letal. Isto porque, a exposição das células a estas condições conduz a uma sobrevivência celular superior a 90% ($102,4 \pm 3,5\%$). Uma vez que a sobrevivência celular obtida é semelhante a 100% de viabilidade foi-se testar se esta concentração era efectivamente uma concentração sub-letal ou uma concentração não letal. Para tal, submeteram-se as células RPE-1 a $5 \mu\text{M}$ de H_2O_2 em estado estacionário durante 6 horas e avaliou-se a sobrevivência celular após este período, $94,7 \pm 2,5\%$. Por este ensaio observou-se que a concentração $5 \mu\text{M}$ de H_2O_2 não é letal se as células forem exposta em estado estacionário durante 4 horas, ver quadro III.2.

Quadro III.2: **Taxa de sobrevivência celular das células RPE-1 com diferentes concentrações de H_2O_2 e tempos de exposição em estado estacionário.** A percentagem de sobrevivência foi determinada pelo ensaio de MTT das células em estado estacionário em relação às células sem qualquer tratamento (células controlo). Todos os ensaios apresentados foram efectuados em triplicado.

Tempo de	[H_2O_2]s.s/ s.s. μM	% sobrevivência \pm desvio padrão
2h	10	$90,4 \pm 5,6$
	5	$102,4 \pm 3,5$
4h	10	$66,7 \pm 3,3$
	14	$66,9 \pm 2,4$
	25	$23,2 \pm 3,2$
	5	$94,7 \pm 2,5$

Porém, devido a limitações de sensibilidade do eléctrodo de dioxigénio e do próprio *software* nem sempre é possível conseguir uma fidedigna manutenção do estado estacionário a $5 \mu\text{M}$ de H_2O_2 durante 6 horas. Assim, de modo a tornar possível a realização do estudo em estado estacionário a concentrações regulatórias de H_2O_2 na linha celular RPE-1 foi necessário a exposição destas a um estado estacionário de $10 \mu\text{M}$ de H_2O_2 mas apenas durante 2 horas. Consequentemente, e atendendo à percentagem de sobrevivência das células ($90,4 \pm 5,6\%$) definiu-se esta concentração de exposição de H_2O_2 durante 2h em estado estacionário como uma concentração sub-letal para as células RPE-1.

Após calibradas as condições de estado estacionário para as células RPE-1, estimou-se as condições de estado estacionário para as células RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 5 nas condições aferidas anteriormente. No quadro III.3 encontram-se resumidos os ensaios de sobrevivência efectuados para esta linha celular.

Quadro III.3: **Percentagem de sobrevivência celular das células RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 5 com diferentes concentrações de H₂O₂ e tempos de exposição em estado estacionário** A sobrevivência é relativa às células com 100% de viabilidade (células sem qualquer tratamento) e foi determinada pelo ensaio de MTT. Todos os ensaios apresentados foram efectuados em triplicado.

Tempo de s.s.	[H₂O₂] s.s./ μM	% sobrevivência ± desvio padrão
2h	10	88,6±1,23
4h	5	101,2 ± 3,5

Pela análise do quadro III.3 observa-se que a exposição em estado estacionário das células RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 5 a 10 e 5 μM de H₂O₂ durante 4 e 2 horas, respectivamente, conduz a uma viabilidade semelhante às observadas para as células RPE-1 (ver quadro III.2 e III.3). Ainda que estas células apresentem uma velocidade de consumo de H₂O₂ distinta, ver figura III.2, observa-se uma igual sensibilidade ao H₂O₂.

Dada a semelhança de comportamentos ao nível da sobrevivência celular, as condições aferidas para o estabelecimento do estado estacionário de H₂O₂ para as células do clone 5 (RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 5) foram análogas às células RPE-1.

Como referido anteriormente as células HeLa apresentam um valor da constante da velocidade de consumo intracelular de H₂O₂ superior ao determinado para as células RPE-1 pelo que, esta linha celular tem uma taxa de metabolização de H₂O₂ superior, o qual poderá estar relacionado, directa ou indirectamente, com a capacidade de as células tumorais sobreviverem num ambiente em que existe uma quantidade superior de espécies reactivas de oxigénio, isto é, em stress oxidativo superior.

Embora a linha celular RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 5 apresente uma constante de consumo de H₂O₂ superior às células RPE-1 ($k_{consumo} = 0,060 \pm 0,008 \text{ min}^{-1}/10^6 \text{ células} \times \text{mL}$ e $k_{consumo} = 0,044 \pm 0,004 \text{ min}^{-1}/10^6 \text{ células} \times \text{mL}$, respectivamente), ambas apresentam uma viabilidade celular semelhante quando expostas a condições similares.

Deste modo, apesar da sobre-expressão da proteína de fusão TBCCD1- GFP conduzir a um aumento da constante da velocidade de consumo não parece alterar a viabilidade celular, comparando ambas as linhas celulares.

Reddy e seus colaboradores mostraram que a exposição a níveis crónicos de H₂O₂ conduz à proliferação de peroxissomas mas também, ao aumento dos níveis de aductos 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) no DNA (Yeldandi *et al*, 2000). Assim sendo, e tendo em conta o acima discutido, a metabolização do H₂O₂ a uma velocidade superior, embora possa estar directa ou indirectamente relacionada com o aumento da sobrevivência das células e sucesso da cancerigénese dependerá em primeiro da capacidade de resposta ao stress oxidativo como o aumento de enzimas responsáveis pela remoção do H₂O₂ e em segundo de

alterações celulares cumulativas, como por exemplo a ocorrência de mutações na sequência de diferentes genes de proteínas supressoras de tumores.

Atendendo aos resultados do presente estudo, não é possível estabelecer uma relação directa entre aumento do nível de TBCCD1, o aumento da velocidade de consumo intracelular de H_2O_2 e aumento da taxa de sobrevivência celular.

Parte II – Análise da influência da sobre-expressão de TBCCD1 no consumo intracelular de H_2O_2

Como foi referido anteriormente, observou-se uma diferença significativa entre a constante da velocidade de consumo das células RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 5 e os seus controlos (RPE-1 e RPE-1 GFP), ver figura III.2. Com o objectivo de compreender de que modo os níveis mais elevados de proteína TBCCD1 influenciam o consumo intracelular de H_2O_2 procedeu-se (i) à análise do tamanho destas células e (ii) ao estudo da constante de velocidade de consumo do H_2O_2 pelo catalase.

II.1. Análise do tamanho das células RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 5

Uma vez que, no silenciamento do gene *tbccd1* em células RPE-1 se observou um aumento do tamanho destas (Gonçalves *et al*, 2010) e, atendendo que a linha celular RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 5 ainda não tinha sido caracterizada, um possível aumento do tamanho celular poderia levar aos resultados observados. Isto porque, ao existir um tamanho maior das células por consequência existirá uma maior área de membrana plasmática pelo que a difusão do H_2O_2 se dará de um modo mais eficaz (Antunes & Cadenas, 2000).

Deste modo caracterizou-se o tamanho destas células por citometria de fluxo através das funcionalidades *Side Scatter* e *Forward Scatter*.

Com base na representação da *Forward Scatter* em função de *Side Scatter* é possível identificar o tamanho médio da população de um conjunto de células e separá-las em diferentes sub-conjuntos consoante o tamanho.

Pela análise dos resultados obtidos (resultados não apresentados) observou-se que a linha celular RPE-1 apresenta uma heterogeneidade de tamanhos das células. Porém, a linha celular RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 5 apresenta essencialmente um único tamanho celular, o qual corresponde a um dos maiores tamanhos presente na população de células heterogéneas detectada na linha RPE-1. Assim, as células RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 5 não são maiores do que as células controlo, todavia constituem uma população mais homogénea de células com um tamanho semelhante ao maior encontrado na população heterogénea das células RPE-1. Este facto pode ser compreendido devido à linha celular RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 5 ser uma

linha monoclonal obtida por *cell sorter*, isto é, proveniente a partir de uma única célula RPE-1 infectada com as partículas virais que continham o gene *tbccd1*, a qual provavelmente era uma célula “relativamente maior” às demais.

O presente resultado mostra que o tamanho das células RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 5 não se encontra alterado pela sobre-expressão da proteína de fusão. Todavia, e tendo em conta que a constante da velocidade de consumo intracelular de H_2O_2 é proporcional à área celular e que esta foi determinada em ambas as linhas celulares (RPE-1 e RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 5) para um igual número de células ($1,7 \times 10^6$ células), existe efectivamente uma maior área de membrana nas células do clone 5 comparativamente ao seu controlo (RPE-1), podendo-se assim justificar a diferença dos resultados de consumo descritos anteriormente.

A análise de tamanho nas células RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 10 e 6, linhas celulares produzidas de modo análogo ao clone 5 mas com expressão de diferentes níveis de TBCCD1-GFP poderá ajudar a esclarecer a relação constante da velocidade de consumo intracelular de H_2O_2 , área celular e níveis de TBCCD1.

II.2. Ensaio cinético do catalase

Atendendo que o consumo intracelular de H_2O_2 depende da velocidade de degradação do H_2O_2 e que o catalase é um dos primeiros e principais enzimas a actuar na remoção deste (revisto em Oliveira-Marques *et al*, 2008), procedeu-se à determinação da constante de velocidade de consumo de H_2O_2 pelo catalase de forma a compreender se o metabolismo de degradação do H_2O_2 se encontrava alterado pelo aumento dos níveis do TBCCD1.

Na figura III.3 encontram-se apresentados os resultados obtidos para a actividade do catalase de células RPE-1 a sobre exprimir a proteína de fusão TBCCD1-GFP permeabilizadas com 1mg/mL de digitonina. A digitonina a esta concentração permite a permeabilização, quer da membrana plasmática, quer da membrana dos restantes organelos, nomeadamente do peroxissoma onde este enzima se localiza maioritariamente.

Pela análise da figura III.3 observou-se que o aumento de quantidade do TBCCD1 leva a um ligeiro aumento da constante de velocidade de consumo de H_2O_2 pelo catalase. Contudo, é necessário um maior número de experiências para analisar se existe ou não uma diferença estatisticamente significativa para o aumento observado.

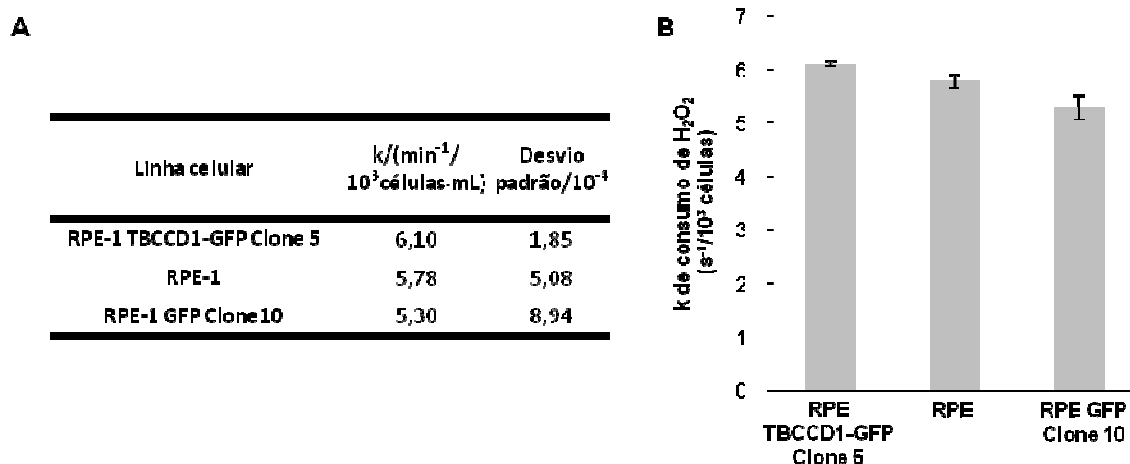


Figura III.3: **Constantes de velocidade de consumo de H₂O₂ pelo catalase em células RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 5, RPE-1 e RPE-1 GFP Clone 10.** O consumo de H₂O₂ de $0,25 \times 10^6$ células, permeabilizadas com 1 mg/mL de digitonina, foi seguido ao longo do tempo. A constante de velocidade deste é obtida através do declive da recta ajustada aos pontos experimentais. Em **A** encontram-se representadas a média e o respectivo desvio padrão dos valores obtidos em 3 experiências independentes, cada uma em duplicado. A projecção destes figura em **B**.

A possibilidade de o TBCCD1 poder influenciar a actividade do enzima catalase, isto é, o metabolismo do H₂O₂, apoia o facto de parecer existir uma relação entre os níveis de proteína TBCCD1 presentes nas diferentes linhas RPE-1 que sobre-expressam a proteína de fusão TBCCD1-GFP e a constante de velocidade de consumo do H₂O₂ destas (ver secção I.1.2.C. “Determinação da constante de velocidade de consumo de H₂O₂ em células RPE-1 que sobre-expressam a proteína de fusão TBCCD1-GFP”).

Caso se confirme uma diferença, estatisticamente significativa, entre a constante de velocidade de consumo de H₂O₂ pelo catalase destas células com o respectivos controlos, dever-se-á determinar a actividade deste enzima para as linhas celulares RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 10 e 6, células que sobre-expressam diferentes níveis de TBCCD1-GFP. Este estudo permitirá validar a relação entre o TBCCD1 e o metabolismo do H₂O₂.

O glutathione peroxidase é outro enzima igualmente responsável pela rápida metabolização do H₂O₂ (Oliveira-Marques *et al*, 2009). Assim, será interessante determinar a constante de velocidade de consumo de H₂O₂ por este enzima pois poderá dar mais informações do possível papel do TBCCD1 na regulação da remoção do H₂O₂ da célula.

Como referido na introdução do presente trabalho, o gradiente de H₂O₂ através da membrana plasmática é definido com a razão entre a soma das actividades dos enzimas que consomem o H₂O₂, em células permeabilizadas, e o seu consumo em células intactas. A sua determinação permite conhecer a concentração de H₂O₂ em estado estacionário no interior da célula (Antunes & Cadenas, 2000). Seria analogamente interessante determinar o gradiente de H₂O₂ nas linhas celulares que sobre-expressam a proteína de fusão TBCCD1-GFP, assim como para

respectivo controlo (células RPE-1). Através deste estudo poder-se-á determinar se a concentração efectiva de H_2O_2 no interior da célula varia com o aumento dos níveis de proteína TBCCD1.

Parte III.– Análise da influência do H_2O_2 nos níveis de proteína TBCCD1

Tendo-se estabelecido as condições de estado estacionário para as diferentes linhas celulares e, com o objectivo estudar-se o possível papel do H_2O_2 na regulação do TBCCD1 foi-se averiguar primeiramente influência do H_2O_2 , a concentrações sub-letais, em células HeLa e depois em células RPE-1.

III.1 Análise da influência do estado estacionário de H_2O_2 na proteína TBCCD1 em células HeLa

III.1.1 Estudo da variação dos níveis de proteína TBCCD1 induzido pelo estado estacionário de H_2O_2 em células HeLa

A influência de concentrações sub-letais de H_2O_2 nos níveis de proteína TBCCD1 foi analisada por *western blot*. Para tal, efectuou-se um estudo ao longo do tempo dos níveis desta após exposição das células HeLa a 25 μ M de H_2O_2 em estado estacionário durante 4 horas.

Tendo como objectivo avaliar se o nível da quantidade total de proteína TBCCD1 era variável com a exposição de H_2O_2 procedeu-se à preparação de extractos de proteínas totais, os quais foram analisados por electroforese em geis desnaturantes SDS-PAGE e posteriormente analisados por *western blot*. Na figura III.4 encontram-se os resultados obtidos para a variação dos níveis de TBCCD1 nos extractos proteicos totais, ao longo tempo, induzida por 25 μ M de H_2O_2 em estado estacionário. Utilizou-se a proteína actina como controlo interno de *loading*.

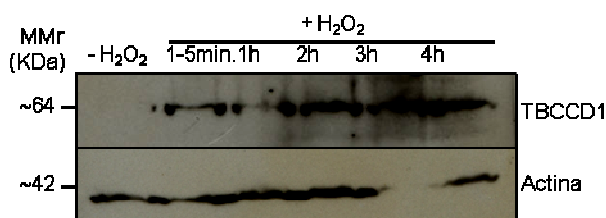


Figura III.4: **Análise da variação do TBCCD1 em extractos proteicos totais de células HeLa submetidas a um estado estacionário.** Células HeLa foram expostas a 25 μ M de H_2O_2 em estado estacionário durante diferentes tempos (1-5 minutos, 1, 2, 3 e 4 horas). Após o período de exposição os extractos celulares foram preparados e analisados num gel SDS-PAGE 12% (m/v). Os níveis de proteína TBCCD1 foram seguidos por *western blot* utilizando um anticorpo policlonal contra o TBCCD1. A membrana de nitrocelulose foi depois incubada com um anticorpo monoclonal contra a actina,

funcionando como controlo interno. Devido aos níveis vestígiais observados para o TBCCD1 nos extractos totais das células controlo (ausência de tratamento) não se realizou a quantificação da variação dos níveis de proteína TBCCD1.

Pela análise da figura III.4 observa-se que na amostra de proteínas totais sem qualquer tratamento ($-H_2O_2$) os níveis da proteína TBCCD1 são vestígiais. Os níveis de actina são igualmente vestígiais nos extractos totais obtidos em células HeLa expostas a $25 \mu M H_2O_2$ em estado estacionário durante 3 horas. Estes factos tornam difícil a análise dos resultados desta experiência única.

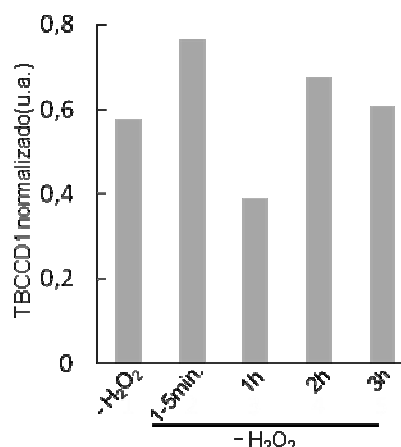
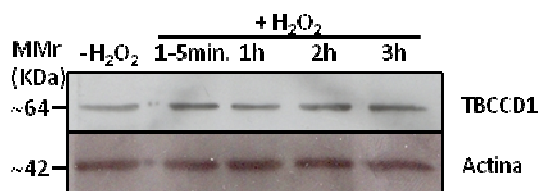
O TBCCD1 é uma proteína pouco abundante na célula (Gonçalves, 2010) o que poderá justificar a fraca detecção em extractos totais das células não expostas a qualquer tratamento. Foram feitas diferentes tentativas para reproduzir este resultado, no entanto, apesar de a análise da actina ter melhorado substancialmente (resultados não apresentados), não se conseguiu uma boa detecção da proteína TBCCD1.

A dificuldade de detecção desta proteína poderá dever-se ao facto deste método para obter extractos proteicos totais não ser o mais adequado para extrair e posteriormente analisar por *western blot* o TBCCD1. A representação da proteína TBCCD1 num extracto total é extremamente baixa o que poderá dificultar o acesso ao anticorpo numa região da membrana de nitrocelulose onde se encontram um grande número de proteínas celulares (60-70 kDa) e por consequência, a visualização do TBCCD1.

Atendendo que se procedeu a uma análise do efeito da exposição de células HeLa a um estado estacionário de $25 \mu M H_2O_2$ durante cerca de 2 min (ss.1-5min) utilizar-se-á estes níveis de proteínas como referência para as restantes condições de estados estacionários efectuados. Deste modo, assiste-se a um aumento dos níveis de TBCCD1 entre as 2 e as 4h de exposição em estado estacionário relativamente a uma exposição curta de 1-5 min. Estes resultados mostram que a exposição prolongada das células HeLa a um estado estacionário de $25 \mu M H_2O_2$ conduz ao aumento dos níveis de TBCCD1.

Dado que houve problemas experimentais com a análise do TBCCD1 em extractos proteicos totais efectuou-se uma extracção diferencial de proteínas citosólicas e nucleares nas mesmas condições anteriores. Este tipo de extracção garante uma purificação parcial das proteínas citosólicas e nucleares, sendo que as proteínas centrossomais, como o TBCCD1 se encontram enriquecidas na fracção nuclear obtida (Gonçalves *et al*, 2010).

A – Extractos de proteínas citosólicas



B – Extractos de proteínas nucleares

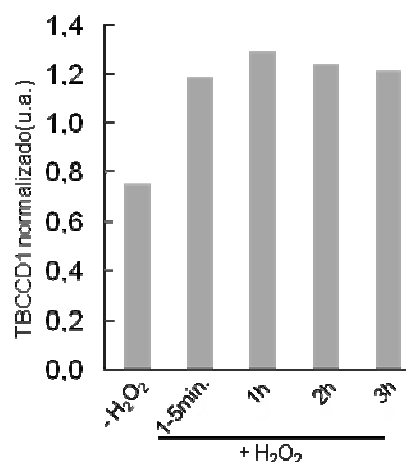
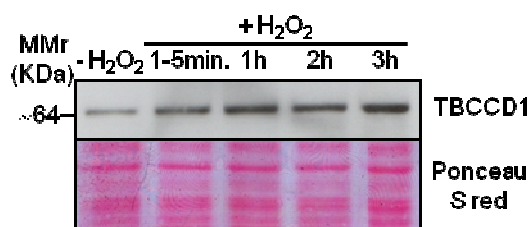


Figura III.5: Níveis da proteína TBCCD1 na fracção citosólica (A) e nuclear (B) em células HeLa expostas a 25 μ M de H₂O₂ em estado estacionário durante diferentes tempos (0, 1-5min., 1, 2 e 3 horas). Foram preparados extractos citosólicos e nucleares e analisados, cerca de 60 e 40 μ g de proteína de cada extracto respectivamente, num gel SDS-PAGE 10% (m/v). Posteriormente, a análise da variação dos níveis de TBCCD1 em cada fracção efectuou-se por *western blot* utilizando um anticorpo contra o TBCCD1. Realizou-se ainda o controlo de *loading* da fracção de proteínas citosólicas pelo *re-blotting* da membrana de nitrocelulose utilizando um anticorpo contra a actina. À direita apresentam-se os gráficos representativos das quantificações de TBCCD1 na fracção citosólica e nuclear normalizadas à actina e ao Ponceau S *red*, respectivamente. Estes resultados correspondem a um ensaio único.

Na figura III.5 encontram-se os resultados da variação dos níveis de TBCCD1 nas fracções citosólica e nuclear de células HeLa expostas a 25 μ M de H₂O₂ em estado estacionário durante diferentes tempos. Os níveis de TBCCD1 na fracção citosólica foram normalizados para a actina, controlo interno. A normalização na fracção nuclear foi efectuada relativamente à coloração da membrana por Ponceau S.

Pela observação do TBCCD1 normalizado ao controlo interno nas respectivas fracções observa-se uma variação dos níveis de TBCCD1 face aos níveis da proteína em ambas as fracções citosólica e nuclear obtidas a partir das células controlo (ausência de tratamento, -H₂O₂).

No caso da fracção citosólica observa-se um aumento rápido dos níveis de TBCCD1 após 1-5 minutos de exposição ao H₂O₂ em estado estacionário (ss1-5min.), os quais decrescem (cerca de 20%), para valores inferiores aos detectados na fracção das células controlo, após 1h de

exposição ao estado estacionário. Após 2h de exposição os níveis de proteína são restabelecidos face aos níveis encontrados nas células sem qualquer tratamento, aumentando aproximadamente 10% em relação ao controlo ($-H_2O_2$). Os níveis de TBCCD1 após 3h de exposição são semelhantes aos níveis observados na fracção citosólica de células controlo.

No caso da fracção nuclear de células HeLa expostas a um estado estacionário de $25\ \mu M\ H_2O_2$ a diferentes tempos, a variação dos níveis de TBCCD1 é mais acentuada. Observa-se nas fracções das células expostas a um estado estacionário curto (1-5min) ou longo (1, 2 e 3h) que os níveis de proteína TBCCD1 são superior aos níveis detectados na fracção correspondente às células controlo ($-H_2O_2$). O aumento observado é próximo dos 60% dos níveis de proteína em todas as fracções em relação aos níveis do controlo, sendo este valor máximo (68%) após uma exposição de $25\ \mu M\ H_2O_2$ em estado estacionário durante 1h. As restantes fracções apresentam níveis de TBCCD1 semelhantes entre si.

Embora nesta análise não tenha sido possível estudar a exposição das células HeLa a $25\ \mu M$ de H_2O_2 em estado estacionário durante 4 horas, globalmente os resultados obtidos estão de acordo com as observações preliminares (figura III.4) obtidas aquando da análise do efeito de H_2O_2 no TBCCD1 por extractos de proteínas totais.

Foram igualmente tentadas diferentes estratégias (aumento da quantidade de proteína citosólica analisada, diminuição da diluição de anticorpo, etc) para reproduzir a variação de TBCCD1 observada na fracção nuclear neste resultado único, e assim aumentar o número de experiências realizadas, porém sem êxito.

De facto, como se mostrará ao longo do presente trabalho a reprodutibilidade de *western blot* contra o TBCCD1 foi bastante limitada pelo que será necessário otimizar o método de análise desta proteína por esta técnica. É de notar que a quantidade de proteína disponível a analisar em cada fracção está limitada ao número de células utilizadas na exposição ao H_2O_2 em estado estacionário (1,5 milhões de células HeLa presentes numa placa de cultura de 90 mm de diâmetro).

O TBCCD1 é uma proteína centrossomal recentemente caracterizada (Gonçalves *et al*, 2010; Gonçalves, 2010; Feldman *et al*, 2009). O *knockdown* do gene *tbccd1* em células humanas (RPE-1) causa a dissociação entre o núcleo e o centrossoma e a desorganização do complexo de Golgi (Gonçalves *et al*, 2010). A perda da ligação entre os centríolos do centrossoma foi observada em *C. reinhardtii* após a perda de função da proteína TBCCD1 (Feldman *et al*, 2009). Em conjunto, estes resultados sugerem que o TBCCD1 é requerido para o correcto posicionamento do centrossoma nestes dois modelos.

No presente estudo, a análise dos níveis de proteína TBCCD1 em células HeLa após exposição a $25\ \mu M\ H_2O_2$ mostram que os níveis desta aumentam na presença de H_2O_2 , em

especial na fracção nuclear. Uma vez que os estudos de caracterização da função desempenhada pelo TBCCD1 foram feitos para o silenciamento do gene *tbccd1*, e não para a sobre-expressão, a comparação da literatura com aumento dos níveis de TBCCD1 na presença de H₂O₂ e as possíveis repercussões na função desempenhada pela proteína na célula são especulativas. Isto porque, o efeito da sobre-expressão de uma proteína não é obrigatoriamente igual ao efeito da diminuição dos níveis desta. De facto, como se mostrou anteriormente, apesar do silenciamento do gene *tbccd1* em células RPE-1 conduzir a um aumento do tamanho destas (Gonçalves *et al*, 2010), este aumento não foi observado aquando da sobre-expressão da proteína de fusão TBCCD1-GFP em células RPE-1, ver secção II.1. “Análise do tamanho das células RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 5”. Assim sendo, seria interessante realizar uma caracterização, a diferentes níveis, da proteína TBCCD1 quando sobre-expressa. Este estudo permitirá compreender o possível papel desta proteína na célula, nomeadamente se algumas das funções do TBCCD1 são dependentes dos níveis estacionários da proteína como a progressão do ciclo celular ou a possível desorganização do complexo de Golgi.

A proteína TBCCD1 partilha os domínios funcionais CARP e TBCC com o cofactor C e a proteína RP2 (Gonçalves *et al*, 2010; Gonçalves, 2010; Feldman *et al*, 2009). Sabe-se que os níveis desta última, em células HeLa, após uma exposição de H₂O₂ por adição *in bolus* de 5 mM e 10 mM durante 20 minutos, aumentam na fracção que contém proteínas nucleares em comparação com os extractos obtidos sem qualquer tratamento. Por microscopia de imunofluorescência observou-se ainda que o aumento observado nesta fracção é devido à translocação da proteína da membrana para o núcleo (Yoon *et al*, 2006).

Embora este estudo tenha sido efectuado a uma concentração de H₂O₂ muito superior à que o presente trabalho foi realizado, ambos os estudos mostram que o H₂O₂ conduz ao aumento do TBCCD1 e da RP2 em células HeLa. Estes resultados indicam uma variação dos níveis das proteínas TBCCD1, e RP2 no mesmo sentido pelo que, estas poderão responder de modo semelhante à alteração da homeostasia de H₂O₂ celular. Deste modo, seria importante avaliar se o cofactor C, outra proteína relacionada com o TBCCD1, é igualmente sensível ao H₂O₂.

Além disso, seria igualmente interessante complementar o estudo do efeito da exposição do H₂O₂ a concentrações sub-letais nos níveis de TBCCD1 por microscopia de imunofluorescência e, observar se esta proteína tal como a RP2 varia a sua localização na presença de H₂O₂. Por exemplo, se a exposição das células a H₂O₂ promove o recrutamento do TBCCD1 do citoplasma para o centróssoma. Estes estudos poderão auxiliar na compreensão do aumento dos níveis de TBCCD1 observados na fracção nuclear após células HeLa serem expostas a 25 µM H₂O₂ em estado estacionário (figura III.5) e também elucidar novas funções para os domínios TBCC e CARP partilhados com as proteínas relacionadas.

III.1.2 Estudo da expressão dos genes *tbccd1* e proteínas relacionadas em células submetidas um estado estacionário de H₂O₂

Os resultados anteriores mostram que o TBCCD1 é uma proteína sensível ao H₂O₂. Por hipótese, o H₂O₂ poderá regular o TBCCD1 pela regulação transcricional do gene que o codifica. Com o fim de validar esta hipótese foi-se investigar os níveis de expressão do gene *tbccd1* em células HeLa.

Assim, o RNA total foi extraído de células HeLa após 25 µM de H₂O₂ em estado estacionário de 1 e 4 horas. A escolha destes tempos deve-se ao facto de após uma hora de exposição se ter obtido, por *western blot*, o nível máximo de indução dos níveis de TBCCD1 na fracção correspondente às proteínas nucleares, ver figura III.5. A exposição durante 4 horas corresponde ao tempo a que esta concentração se torna sub-letal.

A análise da expressão foi realizada por RT-PCR semi-quantitativo em condições não saturantes e a expressão dos respectivos genes foi normalizada tendo como referência o transcrito do gene que codifica para a proteína HPRT, hipoxantina guanina fosforibosil transferase 1.

Uma vez que se sabe que a proteína RP2 é sensível à presença de H₂O₂ (Yoon *et al*, 2006), como acima referido, estudou-se também a expressão dos genes que codificam para o cofactor C e para a RP2, proteínas relacionadas com o TBCCD1, de modo a compreender se existe um efeito semelhante ou não da presença de H₂O₂ entre proteínas que partilham os mesmos domínios funcionais.

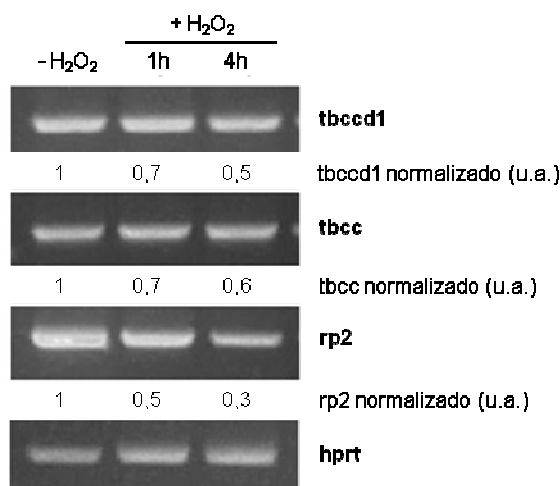


Figura III.6: **Expressão dos genes *tbccd1*, *tbcc* e *rp2* pela exposição de 25 µM de H₂O₂ em células HeLa durante 1 e 4 horas em estado estacionário.** Os produtos de RT-PCR dos cDNAs obtidos a partir dos RNAs totais nas condições anteriores foram separados num gel de agarose de 1% (m/v), e os níveis de mRNA foram padronizados em relação ao gene que codifica para a HPRT. Os valores desta variação encontram-se representados abaixo do respectivo produto. Os resultados apresentados provêm de uma única experiência.

A análise dos resultados únicos e preliminares da figura III.6 mostram que o H_2O_2 altera os níveis de expressão dos genes *tbccd1*, *tbcc* e *rp2* e que a variação destes é variável com o tempo de exposição ao H_2O_2 .

Observa-se que os níveis de mRNA padronizados do gene *tbccd1* decrescem com o tempo de exposição do H_2O_2 comparativamente com os níveis de mRNA proveniente de células sem qualquer tratamento ($-H_2O_2$). Após 1h de exposição em estado estacionário a 25 μM de H_2O_2 o nível do produto de expressão do gene *tbccd1* decresce cerca de 30%, sendo que após 4h de exposição apenas metade da quantidade de mRNA se encontra presente comparativamente ao controlo.

Este resultado evidencia que o H_2O_2 deverá ser capaz de regular o TBCCD1 ao nível da regulação transcricional. Contudo, uma vez que se observou anteriormente por *western blot* que os níveis de TBCCD1 tendem a aumentar na fracção nuclear, deverão existir outros pontos de regulação da expressão génica do TBCCD1 pelo H_2O_2 capazes de infligir este aumento de níveis mesmo perante uma diminuição do nível de transcrição observado.

Uma outra hipótese é o nível de expressão do genes *tbccd1* diminuir como resposta ao aumento dos níveis de proteína na célula aquando da exposição ao H_2O_2 a concentrações próximas das consideradas como reguladoras dos processos fisiológicos.

A análise da figura III.6 evidencia ainda uma similitude entre a diminuição do nível de expressão do gene *tbccd1* e dos níveis de mRNA das proteínas que partilham os domínios funcionais TBCC e CARP, sendo a variação dos níveis de expressão do gene semelhante no caso do Cofactor C. No caso da proteína RP2, esta diminuição é mais notória uma vez que, depois de 1h de exposição das células HeLa, a concentrações sub-letais de H_2O_2 , o nível de expressão decresceu para metade e após uma exposição durante 4h esta decresceu cerca de 70%.

Estes resultados evidenciam a possibilidade de existir uma sobreposição da regulação destas proteínas pelo H_2O_2 , uma vez que existe uma semelhante influência do H_2O_2 na variação dos níveis de mRNA padronizados dos genes *tbccd1*, *tbcc* e *rp2*. A realização da análise da variação da expressão destes genes ao longo de mais tempos até uma exposição máxima de 4 horas de 25 μM de H_2O_2 poderá elucidar com maior clareza a variação dos níveis destes.

De facto, como já discutido anteriormente, tanto a proteína TBCCD1 como a proteína RP2, em células HeLa, embora a concentrações de H_2O_2 distintas, apresentam um comportamento semelhante nos níveis destas na fracção nuclear (figura III.5 e Yoon *et al*, 2006). Estes resultados sugerem a possibilidade do H_2O_2 , em células HeLa, poder regular os níveis de TBCCD1 e das proteínas relacionadas, Cofactor C e RP2 de um modo análogo. Assim sendo,

seria extremamente interessante realizar um estudo da influência do H_2O_2 para o conjunto destas proteínas de modo a validar hipótese acima proposta.

III.2 Estudo da variação dos níveis de proteína TBCCD1 pelo estado estacionário de H_2O_2 em células RPE-1

Atendendo que se pretende avaliar a hipótese de o TBCCD1 participar no desenvolvimento tumoral de um modo dependente do H_2O_2 estudou-se, para além da linha celular HeLa, a linha celular RPE-1 com o objectivo de determinar se os níveis da proteína TBCCD1 variam distintamente em linhas celulares tumorais e linhas fenotipicamente normais quando expostas a um estado estacionário de H_2O_2 .

Como referido na introdução do presente trabalho, o TBCCD1 encontra-se em maior quantidade nas linhas celulares tumorais, como as células HeLa, do que em linhas celulares não tumorais e fenotipicamente “normais”, como as células RPE-1 (Gonçalves, 2010). Tendo em conta a quantidade de proteína média proveniente da fracção nuclear ($\pm 20 \mu g$) aquando da extracção de proteínas citosólicas e nucleares e, a linha celular utilizada neste estudo procurou-se uma nova estratégia para maximizar a quantidade de proteína obtida nesta fracção em células RPE-1 e, desse modo, diminuir a probabilidade de insucesso do ensaio. Assim, procedeu-se à preparação de proteínas citosólicas como anteriormente mas depois, procedeu-se à solubilização do sedimento obtido, isto é, à solubilização da fracção insolúvel sem qualquer etapa de lavagem ou purificação adicional.

Embora se tenha adoptado a esta nova metodologia não foi obtido nenhum resultado para esta linha celular, isto porque a quantidade de proteína disponível a analisar em cada fracção está limitada ao número de células presente numa placa de cultura de células de 90 mm de diâmetro na qual é estabelecido o estado estacionário de H_2O_2 (1,7 milhões de células RPE-1 presentes numa placa de cultura de 90 mm de diâmetro).

Portanto, e como alternativa procedeu-se ao presente estudo numa linha celular RPE-1 que sobre-expressa constitutivamente a proteína de fusão TBCCD1-GFP, a linha RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 5.

III.2.1 Estudo da variação dos níveis de proteína TBCCD1 pelo estado estacionário de H_2O_2 em células RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 5

Devido a limitações experimentais, optou-se pelo estudo da variação dos níveis de proteína TBCCD1 em células que expressam constitutivamente a proteína de fusão TBCCD1-GFP submetidas a H_2O_2 em estado estacionário.

Na figura III.7 encontra-se um resultado representativo do estudo da variação dos níveis de TBCCD1 em células RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 5 expostas a 10 μM de H_2O_2 em estado estacionário durante 1 e 2 horas. Nestes resultados observa-se a detecção dos níveis de proteína TBCCD1 endógena e da proteína de fusão TBCCD1 nas diferentes fracções de extractos de proteínas citosólicas (figura III.7 A). No caso das fracções provenientes da solubilização da fracção insolúvel, figura III.7 B, apenas se detectou a proteína de fusão TBCCD1-GFP, possivelmente devido à quantidade de TBCCD1 presente no extracto analisado (Gonçalves, 2010).

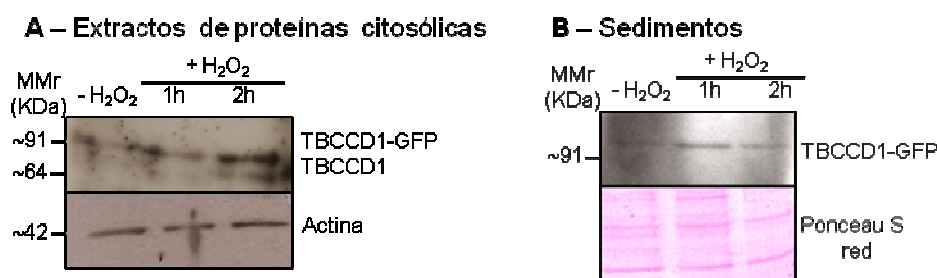


Figura III.7: Níveis da proteína TBCCD1 na fracção citosólica (A) e no sedimento solúvel (B) em células RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 5 após exposição de 10 μM de H_2O_2 em estado estacionário durante 1 e 2 horas. Foram preparados extractos proteicos citosólicos e solubilizados os sedimentos obtidos sem qualquer etapa de lavagem ou purificação adicional. Cerca de 65 μg de proteínas citosólicas e o sedimento solúvel de cada fracção aos diferentes tempos foram analisados num gel SDS-PAGE 12% (m/v) seguido de um *western blot* utilizando um anticorpo contra o TBCCD1 determinou-se a variação dos níveis de TBCCD1. Efectuou-se ainda o controlo de *loading* da fracção de proteínas citosólicas pelo *re-blotting* da membrana de nitrocelulose utilizando um anticorpo contra a actina. Este resultado é representativo de duas experiências independentes. Devido ao *background* não se procedeu à quantificação da intensidade das respectivas bandas.

A análise dos resultados dos extractos de proteínas citosólicas (figura III.7 A) mostrou que os níveis de TBCCD1-GFP aumentam ao longo do tempo de exposição de H_2O_2 ao longo do tempo (1 e 2h) comparativamente às células sem qualquer tratamento ($-\text{H}_2\text{O}_2$).

Observa-se ainda níveis vestígias de TBCCD1 endógeno nas células expostas a 10 μM de H_2O_2 durante 1h contudo, às 2h de exposição de H_2O_2 , em estado estacionário, os níveis de proteína endógena são claramente visíveis. Deste modo, os resultados sugerem que tanto os níveis de proteína endógena como de proteína de fusão TBCCD1-GFP aumentam ao longo do tempo de exposição ao H_2O_2 .

O facto de a proteína de fusão TBCCD1-GFP ser analogamente sensível ao H_2O_2 sugere que esta espécie reactiva de O_2 poderá regular o TBCCD1 pós-transcricional. Isto porque, a linha celular RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 5 é uma linha monoclonal que foi obtida pela infecção de células RPE-1 com partículas virais que continham o plasmídeo recombinante pHR-SIN-TBCCD1-GFP (Gonçalves, 2010). Assim, embora a proteína de fusão TBCCD1-GFP apresenta um comportamento similar à proteína TBCCD1, o vector da construção não partilha a região promotora do gene *tbccd1* que codifica a proteína endógena dado que é expressa constitutivamente.

Na figura III.7B apresentam-se os resultados obtidos para as diferentes fracções de sedimento solúvel de células RPE-1 TBCCD1–GFP Clone 5 expostas a 10 μM de H_2O_2 durante 1 e 2h. Pela análise destes observa-se que os níveis da proteína de fusão TBCCD1-GFP não variam muito em relação às células sem qualquer tratamento ($-\text{H}_2\text{O}_2$), pelo que se poderá afirmar que a proteína TBCCD1-GFP nesta fracção não variável pela exposição das células a H_2O_2 . Para confirmar esta hipótese será necessário um maior número de experiências.

Além disso, este estudo poderá ser complementado pela análise por microscopia de imunofluorescência de modo a acompanhar a variação da proteína de fusão TBCCD1-GFP e da proteína endógena nesta linha celular após exposição de H_2O_2 a concentrações sub-letais no centróssoma e na fracção citosólica, onde ambas as proteínas se localizam.

Um dos objectivos propostos no presente trabalho foi determinar se os níveis da proteína TBCCD1 variam de modo diferente entre linhas celulares tumorais e células fenotipicamente normais expostas a um estado estacionário de H_2O_2 .

De facto, a análise dos níveis de TBCCD1 em células HeLa e células RPE-1 mostrou um comportamento distinto. Embora em ambas as linhas celulares a exposição a concentrações sub-letais de H_2O_2 conduza ao aumento dos níveis de proteína TBCCD1, este aumento, no caso das células HeLa ocorre na fracção de proteínas nuclear. Por oposição, nas células RPE-1 TBCCD1–GFP Clone 5 o aumento foi observado na fracção citosólica. A serem confirmados estes resultados preliminares existirá um diferente comportamento da proteína TBCCD1 em linhas tumorais e linhas fenotipicamente normais.

Embora não existam dados suficientes que permitam discutir correctamente a variação dos níveis de TBCCD1 pela exposição ao H_2O_2 em estado estacionário, o conjunto de resultados apresentados corroboraram a ideia que o H_2O_2 influencia os níveis de TBCCD1 e, sugerem uma distinta modulação dos níveis deste em linhas celulares tumorais, células HeLa, e não tumorais como a linha celular RPE-1 TBCCD1–GFP Clone 5.

Parte IV.– Análise da influência do H_2O_2 na proteína γ -tubulina

No presente trabalho, para além de se estudar se concentrações sub-letais de H_2O_2 , em estado estacionário, afectam a proteína TBCCD1 procedeu-se também ao estudo de outra proteína centróssomal, a γ -tubulina, uma proteína chave na nucleação dos microtúbulos. Tal como realizado para o TBCCD1, o estudo da γ -tubulina foi efectuado em células HeLa e RPE-1.

A influência do H_2O_2 ao longo do tempo na γ -tubulina foi acompanhada primeiramente na linha celular HeLa.

IV.1 Análise da influência do estado estacionário de H_2O_2 na proteína γ -tubulina em células HeLa

IV.1.1 Estudo da variação dos níveis de γ -tubulina induzido pelo estado estacionário de H_2O_2 em células HeLa

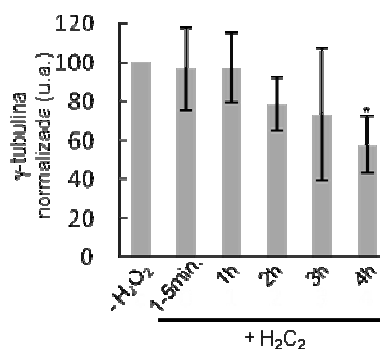
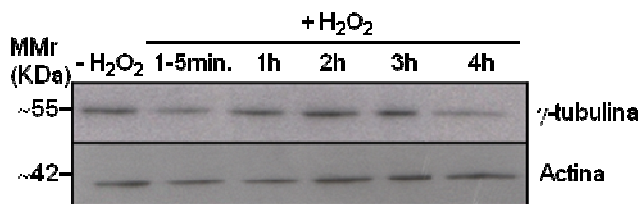
De modo a averiguar se o H_2O_2 , a concentrações sub-letais, desempenha um papel na regulação da γ -tubulina foi-se estudar primeiramente se o H_2O_2 é capaz de influenciar nos níveis desta proteína em células HeLa.

Na figura III.8 apresenta-se um resultado representativo e as respectivas quantificações das variações ao longo do tempo dos níveis de γ -tubulina normalizada na fracção citosólica e nuclear de células HeLa expostas a 25 μM de H_2O_2 em estado estacionário.

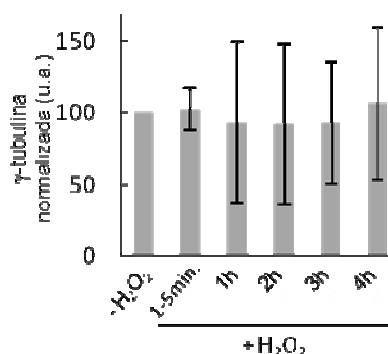
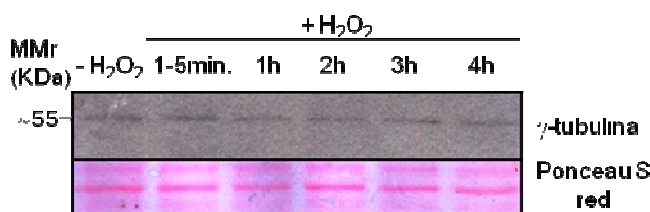
De modo análogo à proteína TBCCD1, a proteína γ -tubulina proveniente da fracção citosólica, foi normalizada em relação à proteína actina e a γ -tubulina resultante da fracção nuclear em relação à coloração da membrana de nitrocelulose com corante *Ponceau S red*. A normalização relativa à coloração da membrana é feita em relação à intensidade de várias bandas correspondentes a distintas proteínas onde, por vezes, a coloração não é homogénea, o que provavelmente justificará um desvio padrão maior face ao uso de uma proteína como controlo interno.

Dado que já foi retratado algumas alterações dos filamentos de actina (F-actina) por H_2O_2 , a altas concentrações (DalleDonne *et al*, 1995), procedeu-se à validação da actina como controlo interno para as condições definidas neste trabalho (25 μM de H_2O_2 em estado estacionário, uma concentração muito mais baixa do que a utilizada nos estudos disponíveis na literatura). Para validar o controlo interno efectuou-se a normalização da γ -tubulina em relação à coloração da membrana de nitrocelulose com corante *Ponceau S red*, ver figura III.8 C. Pela análise desta, observou-se que a γ -tubulina apresenta uma variação semelhante e independente da estratégia de normalização escolhida. Como a normalização a uma proteína conduz a uma menor dispersão dos valores observados e, conseqüentemente a um desvio padrão menor optou-se por se normalizar a γ -tubulina da fracção citosólica à actina.

A – Extractos de proteínas citosólicas



B – Extractos de proteínas nucleares



C – Validação do controlo interno

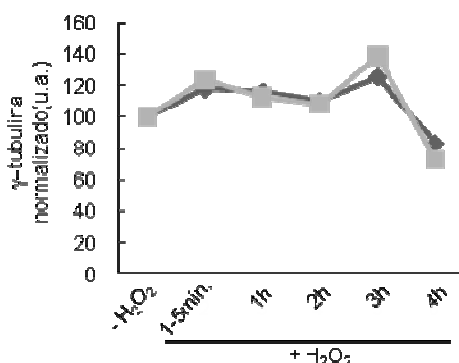


Figura III.8: **Análise dos níveis da proteína γ -tubulina na fracção citosólica (A) e nuclear (B) em células HeLa expostas a 25 μ M de H₂O₂ em estado estacionário durante diferentes tempos (0, 1-5min., 1, 2, 3 e 4 horas).** Foram preparados extractos citosólicos e nucleares, cerca de 60 e 25 μ g de proteína de cada extracto respectivamente e, analisados num gel SDS-PAGE 10% (m/v). Seguiu-se a variação dos níveis da proteína γ -tubulina por *western blot* utilizando um anticorpo contra a mesma. Realizou-se ainda o controlo de *loading* da fracção de proteínas citosólicas pelo *re-blotting* da membrana utilizando um anticorpo contra a actina. À direita das figuras (A) e (B) encontra-se o gráfico relativo às quantificações de γ -tubulina na fracção citosólica e nuclear normalizadas à actina e ao Ponceau S red, respectivamente. Em (C) figura a análise dos níveis da proteína γ -tubulina da fracção citosólica normalizada à coloração da membrana de nitrocelulose com corante Ponceau S red —●— e à proteína actina —■— em células HeLa nestas condições. Este é um resultado representativo do observado para as demais experiências. Os resultados apresentados são representativos de um total de n=6 e n=4 para a fracção citosólica e nuclear, respectivamente. *P=0,003 vs controlo.

É de realçar que os resultados da figura III.8 são representativos de um total de n=6 e n=4 experiências independentes para proteína γ -tubulina presente na fracção citosólica e nuclear, respectivamente. Embora tenham sido realizados um número de experiências independentes

considerável, os desvios padrão continuam a ser bastante grande pelo que, será necessário um maior número de experiências para estes diminuírem.

Em parte, dispersão de resultados observados deveu-se ao presente trabalho ter sido realizado, em estado estacionário, a concentrações de H_2O_2 sub-letais, isto é, a concentrações tais que após a exposição deste, as células apresentam uma viabilidade celular próxima de células sem qualquer tratamento. Portanto, o estudo do efeito H_2O_2 a estas concentrações e por este método de exposição de H_2O_2 permitem a análise do papel regulador do mesmo, contrariamente à adição *in bolus* ou ao método glucose oxidase, como referido na introdução do presente trabalho (Oliveira-Marques *et al*, 2009).

Idealmente a titulação do estado estacionário permite a manutenção dos níveis de H_2O_2 em estado estacionário, isto é, uma exposição a níveis constante de H_2O_2 (Antunes & Cadenas, 2000) porém, e considerando os níveis de H_2O_2 utilizados nem sempre se conseguiu uma exposição a 25 μM constante ao longo do tempo. Assim, considerou-se que se obteve uma exposição a 25 μM de H_2O_2 em estado estacionário sempre que a concentração de H_2O_2 detectada no ensaio apresentou um desvio de 15%, isto é, se determinou uma concentração entre 21 e 29 μM . Ainda que apenas a concentração sub-letal de H_2O_2 varia-se no máximo 15%, esta espécie reactiva de oxigénio ao estar mais ou menos concentrada induzirá mais ou menos influência nos níveis de proteína γ -tubulina, pelo que esta esta pode ser a razão para a observação de uma dispersão estatística tão grande. É igualmente de salientar que as variações observadas são sempre muito pequenas, deste modo, e atendendo ao anteriormente examinado, será necessário realizar um maior número de experiências para se observar a diminuição da dispersão dos resultados e, provavelmente uma diferença estatisticamente significativa na diferença dos níveis de γ -tubulina em mais do que um tempo de exposição a H_2O_2 por comparação ao controlo.

Após normalizados os níveis de γ -tubulina em ambas as fracções analisadas, ver figura III.8, observa-se que os níveis desta, na fracção citosólica, tendem a diminuir a partir da segunda hora de exposição a 25 μM de H_2O_2 em estado estacionário, $85 \pm 13,7$ %, sendo que às 4 horas, fim do tempo de exposição, se atinge o valor mínimo para os níveis de γ -tubulina no citosol ($58 \pm 14,8$ %, $P = 0,003$ vs. células sem qualquer tratamento, “ $-H_2O_2$ ”).

Os níveis de proteína mantiveram-se mais ou menos inalteráveis ao longo do tempo na fracção nuclear, a qual se encontra enriquecida em centrossomas. A quantificação da γ -tubulina nesta fracção está associada a um grande desvio padrão, por um lado devido às razões acima expostas por outro, à fraca coloração da membrana de nitrocelulose com o corante Ponceau S, *red* e consequente fraco sinal obtido no *western blot*.

Pela metodologia adoptada não é possível concluir com clareza qualquer variação da γ -tubulina no centrossoma, onde maioritariamente esta proteína se localiza e medeia a nucleação dos microtúbulos (Fuller *et al*,1995; Raynaud-Messina & Merdes, 2007). Isto porque, através deste, ainda que exista uma extracção diferencial entre proteínas citosólicas e nucleares, a separação das proteínas centrossomais não é tão clara.

Deste modo, realizou-se paralelamente um estudo da localização da proteína γ -tubulina em células HeLa expostas a 25 μ M de H_2O_2 em estado estacionário por microscopia de imunofluorescência indirecta, dando especial ênfase ao centrossoma, ver figura III.9.

A γ -tubulina é uma proteína que se localiza no material pericentrional (PCM) e centríolos dos centrossomas (Fuller *et al*,1995), existindo também na fracção citosólica da célula. Na figura III.9 A observa-se a típica imunomarcacção de células com um anticorpo contra γ -tubulina, no citoplasma celular e no centrossoma, ver setas na figura III.9. A imunomarcacção desta proteína no centrossoma foi observada quer em células na interfase, quer em células em mitose (figura III.9 A e resultados não apresentados).

A influência do H_2O_2 na γ -tubulina foi observada, por microscopia de imunofluorescência, às 2 e 4 horas de células submetidas a 25 μ M de H_2O_2 em estado estacionário (figura III.9). A escolha destes tempos deveu-se (i) a apenas após 2 horas de exposição se observar alterações dos níveis de γ -tubulina na fracção citosólica, aquando da análise dos extractos proteicos citosólicos e nucleares por *western blot* e, (ii) ao facto de ser ter observado uma diminuição significativa dos níveis desta proteína na fracção citosólica em células expostas a estado estacionário de H_2O_2 a concentrações sub-letais durante 4 horas, ver figura III.8.

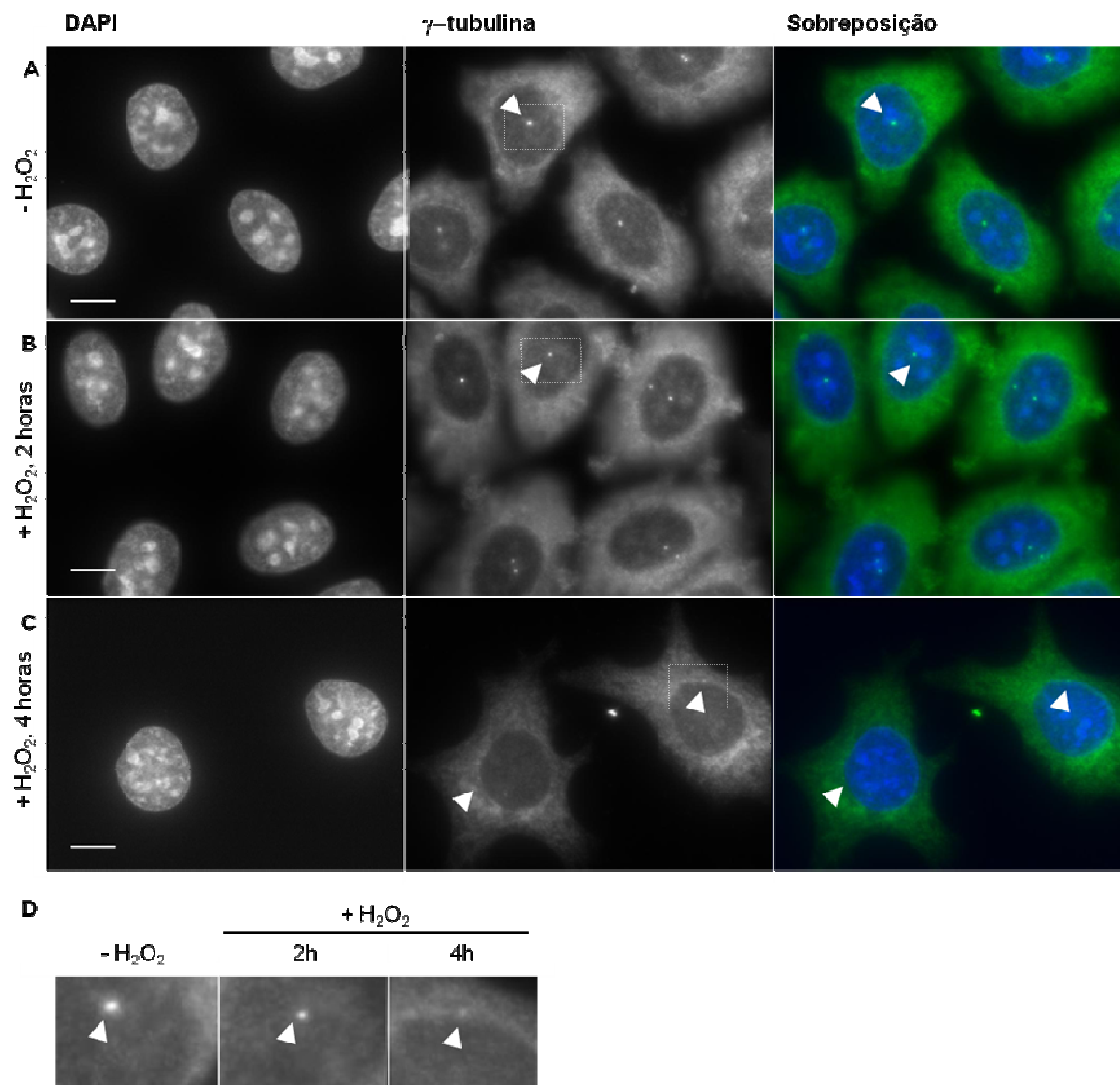


Figura III.9: **Análise por microscopia de imunofluorescência da localização da γ -tubulina após exposição de células HeLa a 25 μM de H_2O_2 em estado estacionário ao longo de 2 e 4 horas, (B) e (C) respectivamente. Em (A) apresentam-se os resultados obtidos para células sem qualquer tratamento ($-H_2O_2$). Todas as células foram processadas com um anticorpo contra γ -tubulina e o seu DNA encontra-se marcado com DAPI. Em (D) figura uma ampliação da marcação γ -tubulina centrossomal das regiões assinaladas nas diferentes condições estudadas. As setas apontam para um centrossoma presente numa célula representativa das situações (A), (B) e (C). Estes resultados são representativos de três experiências independentes.**

A partir dos resultados da figura III.9, nomeadamente a figura III.9 A, constatou-se que à medida que o estado estacionário de H_2O_2 progride ocorre uma diminuição da intensidade de fluorescência da γ -tubulina nos centrossomas. Este resultado sugere uma menor quantidade de γ -tubulina no centrossoma, pelo que a função da proteína, nomeadamente ao nível da capacidade nucleadora de microtúbulos, poderá estar afectada.

A localização da γ -tubulina foi relacionada com o aumento do nível de malignidade de diferentes linhas celulares de cancro da mama (Cho *et al*, 2010) como o aumento da

capacidade de invasão e metastização, por exemplo. Nas linhas consideradas menos malignas, logo menos agressivas, a γ -tubulina encontra-se preferencialmente no centróssoma, mas à medida que a agressividade aumenta nas diferentes linhas esta passa a deslocalizar-se do centróssoma para o citoplasma.

De facto, observou-se que o H_2O_2 é capaz de diminuir a intensidade de γ -tubulina centróssomal porém, seria necessário efectuar mais estudos para relacionar a agressividade de diferentes linhas tumorais com o H_2O_2 nestas condições experimentais. Além disso, os resultados obtidos para os níveis de γ -tubulina na fracção citosólica por *western blot*, figura III.8 A, apenas mostraram uma variação destes níveis depois das células expostas a 2 horas de H_2O_2 a 25 μ M em estado estacionário.

Uma vez que se observou a este tempo uma diminuição da intensidade de γ -tubulina por microscopia de fluorescência, pode-se supor que, a γ -tubulina está a ser deslocalizada do centróssoma para o citoplasma mascarando a diminuição efectiva da proteína nesta fracção nos tempos de exposição inferior a 2 horas de H_2O_2 a concentrações sub-letais.

A realização deste estudo na presença de um marcador centróssomal, como a proteína IFT88, permitiria uma melhor avaliação da diminuição da intensidade da γ -tubulina no centróssoma, pelo que seria possível, por exemplo, a quantificação desta após as células serem tratadas com H_2O_2 em estado estacionário.

Comparando a intensidade da proteína γ -tubulina citoplasmática nas diferentes condições a que as células HeLa foram expostas (figura III.9 A, B e C), é difícil inferir com clareza qualquer variação no citoplasma entre células expostas a H_2O_2 e células sem qualquer tratamento (controlo). Contudo, embora a exposição a H_2O_2 altere a forma da célula, a análise da figura III.9 C sugere uma diminuição da intensidade de γ -tubulina no citoplasma nas células expostas durante 4 horas relativamente ao controlo, de acordo com o observado anteriormente nos estudos por *western blot*. Deste modo, ambos os estudos parecem mostrar resultados coincidentes. É de salientar que estes estudos foram realizados a concentrações sub-letais, isto é, a concentrações que induzem menos de 10 % de morte celular após exposição. Portanto a alteração da forma celular não será devida a fenómenos de apoptose ou necrose e, a diminuição da proteína γ -tubulina não será devido à activação destes processos celulares.

Em conclusão, o H_2O_2 a baixas concentrações afectou os níveis de γ -tubulina na fracção citosólica e a sua localização no centróssoma pelo que, a capacidade de nucleação de microtúbulos centróssomal poderá estar afectada.

Sabe-se que a nucleação dos microtúbulos durante a mitose aumenta cerca de 5 vezes e a concentração centróssomal de γ -tubulina apresenta um máximo na metáfase. A acção de anti-

corpos contra a γ -tubulina induziu uma diminuição efectiva da nucleação durante a metáfase (Piehl *et al*, 2004).

Pela avaliação da recuperação dos microtúbulos após despolimerização da rede microtubular com nocodazole e posterior remoção deste foi-se averiguar a possibilidade de a diminuição de proteína γ -tubulina afectar a nucleação dos microtúbulos.

IV.1.2 Avaliação da capacidade de nucleação por parte do centróssoma em células submetidas um estado estacionário de H_2O_2

Para se avaliar a capacidade de nucleação e ancoramento de microtúbulos do centróssoma se encontra afectada na presença de concentrações sub-letais de H_2O_2 , procedeu-se à exposição de células HeLa durante 4 horas a 25 μM de H_2O_2 em estado estacionário e seguidamente foram tratadas com 30 μM de nocodazole durante 40 minutos, um agente despolimerizador da rede de microtúbulos. Após remoção deste e lavagens das células, a rede de microtúbulos foi analisada a diferentes tempos de recuperação (5 e 30 minutos) por imunofluorescência indirecta, ver figura III.10 e III.11.

Aquando da realização deste ensaio não foi efectuado controlo negativo, isto é, não se efectuou a análise da organização da rede de microtúbulos sem qualquer tratamento com nocodazole. Para tal dever-se-ia ter processado, para posterior análise por microscopia de imunofluorescência indirecta, o citoesqueleto de microtúbulos de células sem qualquer tratamento, controlo dos resultados presentes na figura III.10, e de células submetidas a um estado estacionário de 25 μM de H_2O_2 durante 4 horas, controlo correspondente à figura III.11, com um anticorpo contra a α -tubulina.

Deste modo, será necessário repetir este ensaio com os respectivos controlos.

Contudo, e com fim a ser possível a discussão dos presentes resultados optou-se por se comparar os resultados obtidos neste estudo com os dados disponível na literatura. Embora se tenha encontrado diferentes estudos que possam ser utilizados como controlos negativos das células sem qualquer tratamento, o mesmo não se observou com as células submetidas a um estado estacionário a concentrações sub-letal. Assim, como alternativa comparou-se os resultados presentes na figura III.11 com o citoesqueleto de microtúbulos marcado com um anticorpo contra a α -tubulina de células MCF-7 submetidas a uma concentração sub-letal de H_2O_2 a 25 μM durante 6 horas (Pedroso, 2003). Nestas células observou-se que a exposição a H_2O_2 afecta a organização da rede de microtúbulos. De facto, as extremidades dos microtúbulos parecem apresentar uma organização menos radial na periferia da célula apresentando-se como que curvados nesta região.

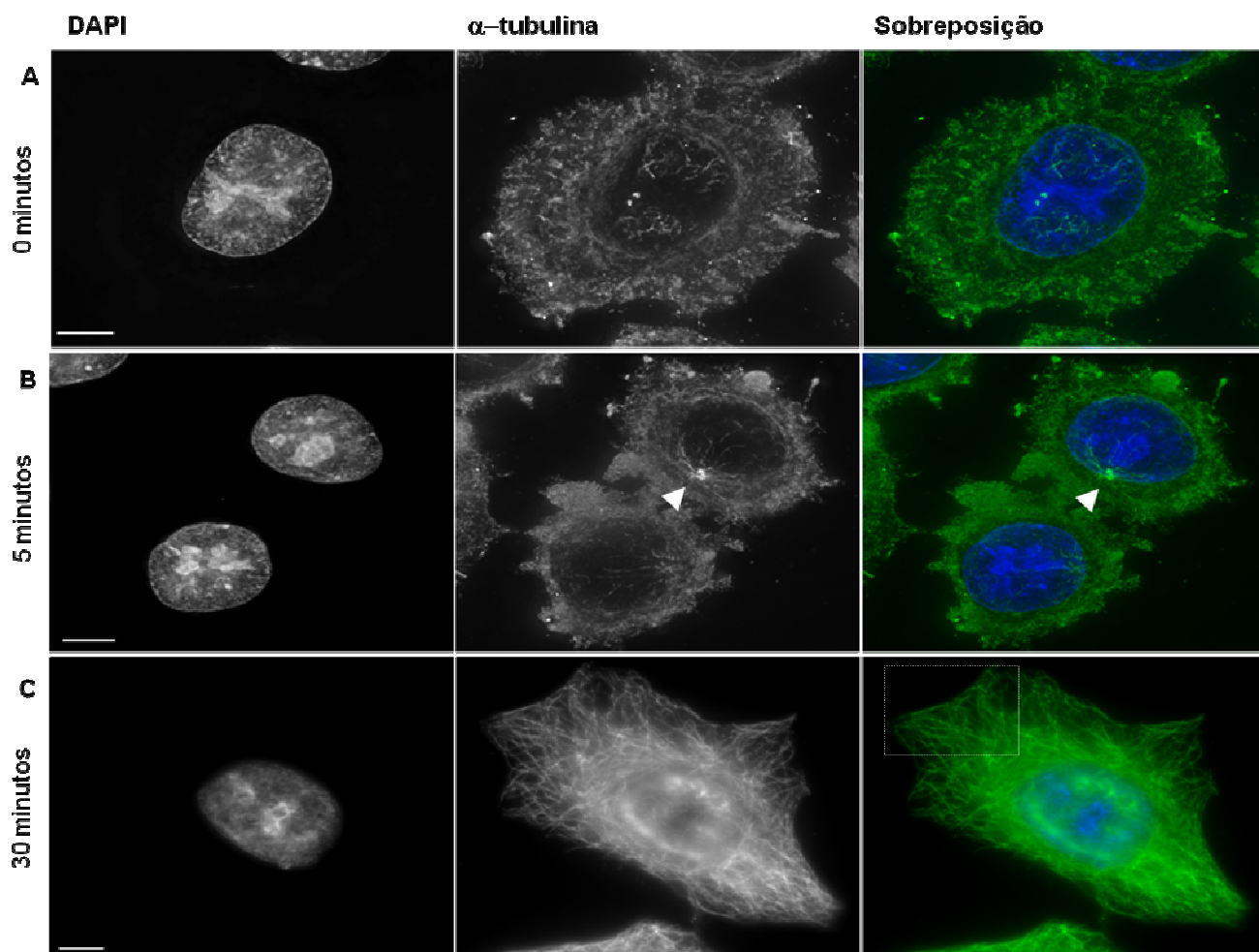


Figura III.10: **Avaliação da capacidade de nucleação por parte do centrosoma em células HeLa.** As células HeLa foram tratadas com 30 μ M de nocodazole durante 40 minutos no final dos quais o agente despolimerizante foi removido. Seguidamente as células foram processadas para a análise por microscopia de imunofluorescência indirecta utilizando o anticorpo α -tubulina a diferentes tempos de recuperação dos microtúbulos: 0, 5 e 30 minutos, correspondentes a (A), (B) e (C). A região assinalada na condição (C) foi ampliada na figura III.12. O DNA encontra-se marcado com DAPI. As pontas de setas apontadam para locais de nucleação de microtúbulos. Os resultados provêm de uma experiência única. As barras de escala correspondem a 10 μ m.

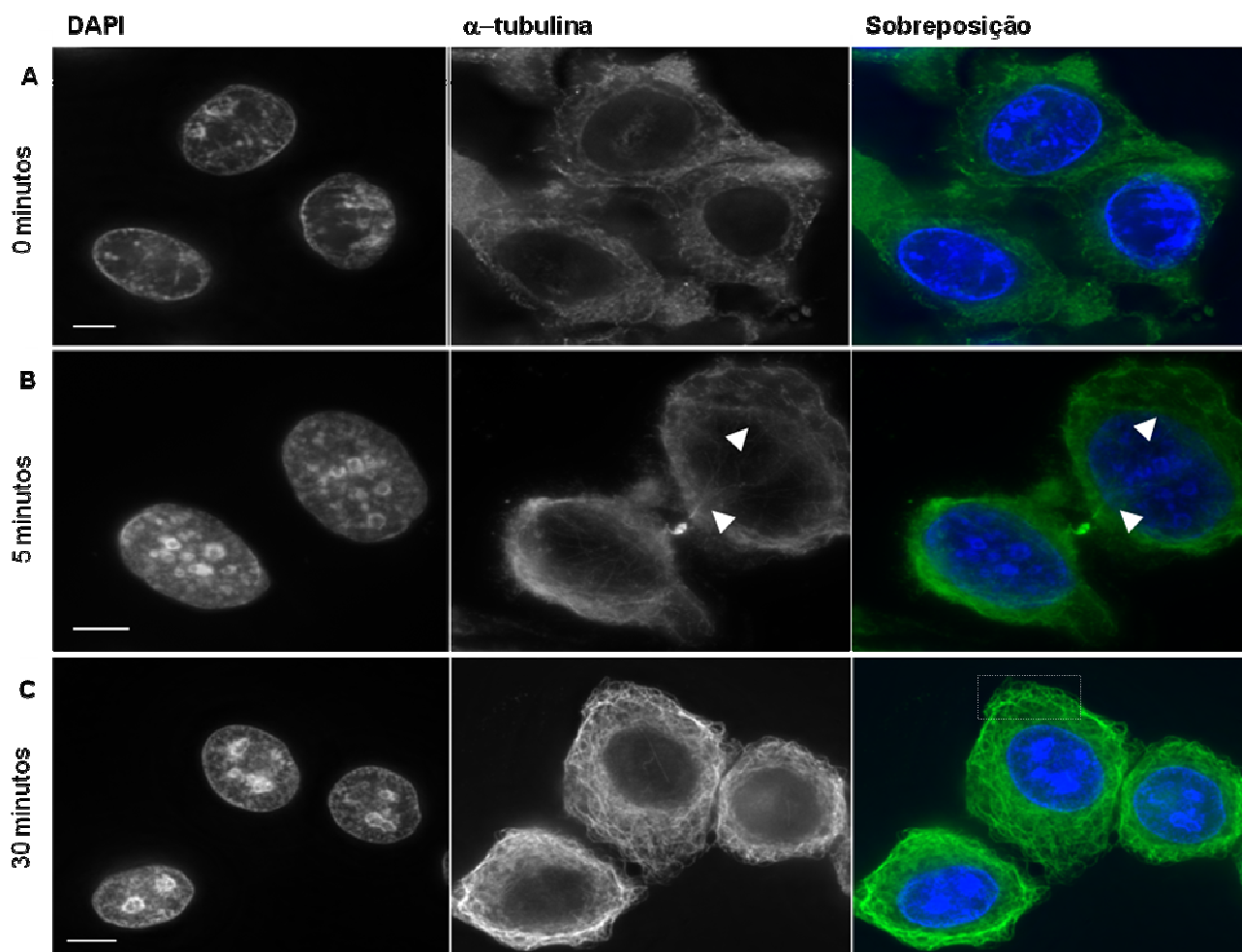


Figura III.13: **Avaliação da capacidade de nucleação por parte do centrosoma em células HeLa submetidas a um estado estacionário de 25 μM de H_2O_2 durante 4 horas.** As células HeLa foram submetidas a um estado estacionário e seguidamente tratadas com 30 μM de nocodazole durante 40 minutos no final dos quais, o agente despolimerizante foi removido. Seguidamente as células foram processadas para a análise por microscopia de imunofluorescência indirecta utilizando o anticorpo α -tubulina a diferentes tempos de recuperação dos microtúbulos: 0, 5 e 30 minutos, correspondentes a (A), (B) e (C). A região assinalada em (C) foi ampliada na figura III.12. O DNA encontra-se marcado com DAPI. As pontas de setas apontam para locais de nucleação de microtúbulos. Os resultados provêm de uma experiência única. As barras de escala correspondem a 10 μm .

Os microtúbulos das células com e sem exposição de H_2O_2 em estado estacionário (figura III.10 A e III.11 A) foram igualmente despolimerizados após tratamento com o nocodazole.

Depois de 5 minutos de recuperação dos microtúbulos, em meio fresco, as células não tratadas, células controlo, figura III.10 B, começaram a refazer o áster de microtúbulos a partir do centrosoma.

No caso das células expostas a H_2O_2 , ver figura III.11 B, a recuperação dos microtúbulos dá-se principalmente por uma nucleação acentrossomal, sendo difícil identificar a formação do áster a partir do centrosoma.

Uma vez que não se utilizou um marcador do centróssoma, como por exemplo a proteína γ -tubulina ou a proteína IFT88, a avaliação com clareza da nucleação centróssomal é mais difícil.

Observou-se que, após as células, com e sem exposição ao H_2O_2 em estado estacionário, serem tratadas com 30 μM de agente despolimerizador e, depois de 30 minutos de recuperação dos microtúbulos, apresentaram a sua rede de microtúbulos praticamente restabelecida, figura III.11 C e III.10 C apesar de diferentemente organizada.

As células expostas ao H_2O_2 , figura III.11 C, apresentaram uma configuração mais desorganizada relativamente ao observado nas células controlo especialmente junto à periferia da célula. As extremidades dos microtúbulos destas células parecem ter uma organização menos radial na periferia da célula apresentando-se como que curvados nesta região, o que não se verifica nas células controlo, ver figura III.12.

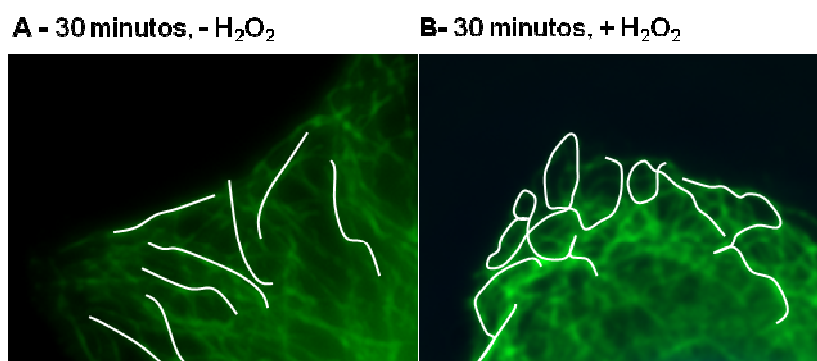


Figura III.12: Ampliação da regiões assinaladas na figura III.10 C e III.11 C de modo a permitir uma melhor análise da rede de microtúbulos junto à periferia de (A) células HeLa sem exposição a H_2O_2 e (B) células submetidas a um estado estacionário de 25 μM de H_2O_2 durante 4 horas após tratamento com 30 μM de nocodazole durante 40 minutos, posterior remoção deste e recuperação do citoesqueleto de microtúbulos durante 30 minutos. As células nas condições (A) e (B) foram processadas de acordo com o descrito nas figuras III.10 e III.11.

De facto esta organização da rede de microtúbulos já foi observada em células MCF-7 expostas a um estado estacionário de aproximadamente 25 μM durante 6 horas (Pedroso, 2003), células utilizadas como alternativa ao controlo negativo deste estudo.

Deste modo, a organização dos microtúbulos observada estará relacionada com a alteração do estado redox da célula.

A curvatura nos microtúbulos existente nestas células poder-se-á dever a possíveis alterações na conformação específica dos heterodímeros de α - e β -tubulina. O heterodímero α - e β -tubulina contém 20 resíduos de cisteínas distribuídas heterogeneamente pela sua estrutura tridimensional (Roychowdhur *et al*, 2000). O resíduo de cisteína, como referido na introdução do presente trabalho, apresenta um grupo tiol o qual é sensível a agentes oxidantes, como o H_2O_2 . Assim, pode-se especular que a organização desta rede de microtúbulos poderá resultar,

em parte, da alteração do nível de oxidação dos grupos de cisteína dos heterodímeros de tubulina. Com fim a confirmar esta hipótese poder-se-á avaliar o nível de oxidação dos heterodímeros de tubulina antes e após exposição ao H_2O_2 .

Uma outra hipótese para a alteração do citoesqueleto de microtúbulos observada é a desigual nucleação destes, ver figura III.10 B e III.11 B. Pode-se compreender esta distinta nucleação do citoesqueleto pelo facto de se ter observado uma menor intensidade de γ -tubulina no centróssoma em células expostas a H_2O_2 durante 4 horas quando comparadas ao respectivo controlo. Isto é, ao os níveis centróssomais da proteína γ -tubulina diminuírem deverá diminuir também a capacidade de polimerização por esta estrutura, tornando mais evidente a nucleação dos microtúbulos noutros locais que apresentem γ -tubulina.

Após silenciamento do gene *Arl2* pela técnica de RNAi em células HeLa observou-se a sobre-expressão do cofactor D e ainda uma organização da rede de microtúbulos anormal, nomeadamente a presença de regiões com microtúbulos curvados (Tian *et al*, 2010). A sobre-expressão do cofactor D humano, a níveis em que os microtúbulos não se encontram despolimerizados, leva alteração dos níveis de algumas proteínas do γ -TuRCs, nomeadamente à perda da γ -tubulina (DICTENBERG *et al*, 1998; CUNNINGHAM, & KAHN, 2008). Deste modo, seria interessante analisar se a exposição de H_2O_2 a estas concentrações reguladoras promove alterações dos níveis do cofactor D.

Para uma melhor análise do modo como a nucleação dos microtúbulos a partir do centróssoma é afectada pelo H_2O_2 em estado estacionário, em concentrações sub-letais, dever-se-á estudar mais pormenorizadamente a recuperação destes durante períodos mais longos para ver se nas células tratadas com H_2O_2 , apesar das alterações detectadas, acabam por organizar um citoesqueleto de microtúbulos semelhante ao das células controlo.

Por outro lado, estas experiências deverão ser realizadas utilizando uma marcação para a γ -tubulina, e mesmo de marcadores de outros MTOCs, como é o caso do complexo de Golgi, com fim a avaliar se existe uma alteração da nucleação de microtúbulos acentrossomal. Embora preliminares, estas experiências mostram que baixas concentrações de H_2O_2 são capazes de alterar a capacidade de nucleação de microtúbulos por parte do centróssoma e uma consequente alterar o citoesqueleto de microtúbulos.

Mais, o facto dos microtúbulos na periferia apresentarem uma região curvada poderá ser um indício de que existe alterações na dinâmica dos microtúbulos. Isto porque, a dinâmica de polimerização/despolimerização dos microtúbulos depende essencialmente da dinâmica da sua extremidade “+”, deste modo, e uma vez que os microtúbulos se encontram alterados nessa região, deverão apresentarem uma capacidade de sofrerem ciclos de crescimento e encurtamento rápido diferentes (MITCHISON & KIRSCHNER, 1984). Assim, seria interessante

explorar a instabilidade dinâmica dos microtúbulos após exposição de células a H_2O_2 em estado estacionário.

Uma vez que o citoesqueleto de microtúbulos é responsável pela organização interna dos organelos celular, como o posicionamento e a organização do complexo de Golgi (Rios & Bornens, 2003) será interessante, por exemplo avaliar se o H_2O_2 influencia directa ou indirectamente a organização do complexo de Golgi, por exemplo através de estudos por microscopia de imunofluorescência usando um anticorpo contra Golgina-97, um marcador do complexo de Golgi.

Alterações da rede de microtúbulos, como por exemplo a despolimerização destes, estão relacionadas com o aumento de fluidez da membrana plasmática (Rémy-Kristensen *et al*, 2000). Por sua vez, sabe-se que a exposição a 150 μM de H_2O_2 em estado estacionário, durante 30 e 60 minutos, em levedura *S. cerevisiae* conduz a uma alteração de fluidez da membrana plasmática (Folmer *et al*, 2008) Deste modo, seria interessante observar que esta alteração na rede de microtúbulos conduz a uma modificação da fluidez da membrana, por exemplo através de estudos de anisotropia com sondas apropriadas.

Observa-se ainda, nas células, com e sem exposição de H_2O_2 , serem tratadas com 30 μM de agente despolimerizador e, depois de 30 minutos de recuperação do áster de microtúbulos, que as células que foram submetidas a um estado estacionário de 25 μM de H_2O_2 são mais pequenas que o respectivo controlo, ver figura III.10 C e III.11 C.

No presente trabalho as células foram expostas a concentrações de H_2O_2 sub-letais pelo que, a diminuição de tamanho não se deverá à activação de processos apoptóticos ou necróticos, os quais se sabe que são induzidos por altas concentrações de H_2O_2 (revisto em Oliveira-Marques *et al*, 2009).

Este resultado observado poderá dever-se à distinta organização do citoesqueleto de microtúbulos das células que foram expostas a H_2O_2 face ao controlo, em especial à curvatura destes junto à região da membrana citoplasmática.

Para além de alterações nos microtúbulos, modificações dos filamentos de actina (F-actina) ou filamentos intermédios poderão ser igualmente responsáveis pela diminuição de tamanho das células submetidas a estado estacionário face ao controlo. Pelo que um estudo mais aprofundado do citoesqueleto, por exemplo por microscopia de imunofluorescência, poderá ajudar na compreensão deste fenómeno.

As integrinas medeiam a adesão celular à matriz extracelular e também regula alterações na forma da célula (Domínguez-Giménez *et al*, 2007). Sabe-se que algumas integrinas, como a ILK (*integrin-linked kinase*) respondem ao stress oxidativo (Saito *et al*, 2004). Assim, a possível

modulação das integrinas pelo H_2O_2 poderá justificar a diminuição de tamanho observada nas células submetidas a um estado estacionário de H_2O_2 a concentrações sub-letais.

IV.1.3 Estudo da expressão do gene γ -tubulina em células submetidas um estado estacionário de H_2O_2

Uma vez que se observou a influência nos níveis de proteína γ -tubulina do H_2O_2 , por *western blot* e microscopia de imunofluorescência indirecta, foi-se avaliar o padrão de expressão do gene desta proteína através RT-PCR semi-quantitativo em células submetidas em estado estacionário de 25 μM de H_2O_2 durante 1 e 4 horas com fim a compreender se o H_2O_2 desempenha algum papel ao nível da regulação da expressão do gene γ -tubulina ou se, as alterações observadas nos níveis da proteína eram devidos apenas a regulações pós-transcricionais.

IV.1.3.1. Optimização das condições de análise

Para se estudar a expressão do gene de γ -tubulina recorreu-se à reacção do transcriptase reversa seguida da reacção em cadeia do polimerase, isto é, a RT-PCR. Após extracção de RNA sintetizou-se, por acção do enzima transcriptase reversa a cadeia de DNA complementar, cDNA. Depois, estes são amplificados por PCR num dado número de ciclos de desnaturação, hibridação e extensão de modo a proceder à análise do transcrito do gene de γ -tubulina em condições não saturantes.

O número de ciclos escolhido é variável com a eficácia de reconhecimento e hibridação dos *primers*, mas também com a abundância relativa na população de cDNA. Assim, procedeu-se à optimização do número de ciclos da reacção de PCR para este ensaio uma vez que, ao contrário, dos estudos efectuados para os genes *tbccd1*, *tbcc* e *rp2* (ver secção III.1.2 “Estudo da expressão dos genes *tbccd1* e proteínas relacionadas em células submetidas um estado estacionário de H_2O_2 ”) não se encontrava aferido.

Na figura III.13 encontram-se representados os produtos de PCR obtidos pela amplificação em número crescente de ciclos (28-32 ciclos). Da sua análise, observa-se um aumento da intensidade da banda correspondente ao produto com o aumento do número de ciclos da reacção. Tendo em conta que se pretende estudar a regulação da expressão do gene de γ -tubulina pelo H_2O_2 e, que este tanto pode induzir como reprimir a expressão do gene, procurou-se um número de ciclos capaz de pôr em evidência ambas as possibilidades, isto é, sem que ocorra a saturação da intensidade da banda correspondente ao produto de PCR ou a fraca visualização desta. Assim, optou-se pela realização da reacção de amplificação com 29 ciclos.

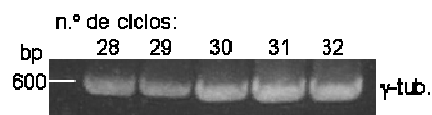


Figura III.13: **Expressão do gene γ -tubulina em células HeLa com número de ciclos crescentes durante a fase de extensão (28-32 ciclos).** Os produtos de RT-PCR dos cDNAs obtidos a partir dos RNAs totais extraídos de células HeLa foram amplificados com um número crescente de ciclos de reacção e separados num gel de agarose de 1% (m/v). Os resultados apresentados advêm de uma única experiência.

IV.1.3.1. Estudo do padrão de expressão do gene γ -tubulina em células HeLa em resposta a um estado estacionário de H_2O_2

Após definido o número de ciclos a utilizar neste estudo procedeu-se à análise da expressão do gene γ -tubulina para as células submetidas a um estado estacionário, tendo-se utilizado como controlo interno o gene *hppt*, ver figura III.14.

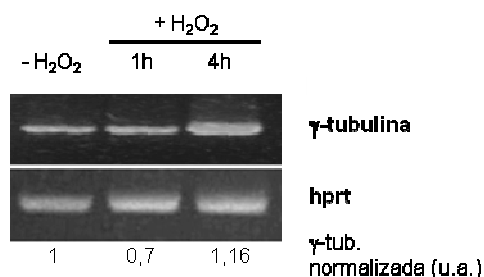


Figura III.14: **Expressão do gene γ -tubulina em células HeLa expostas a 25 μ M de H_2O_2 em estado estacionário durante 1 e 4 horas.** Os produtos de RT-PCR dos cDNAs obtidos a partir dos RNAs totais nas condições anteriores foram separados num gel de agarose de 1%, e os níveis de mRNA foram padronizados em relação ao gene que codifica para a HPRT. Os valores desta variação encontram-se representados abaixo do respectivo produto. Os resultados apresentados provêm de uma única experiência.

A análise da figura III.14, mostrou uma diminuição da expressão do gene γ -tubulina de aproximadamente 30% após 1 hora de exposição ao H_2O_2 contudo, ao fim de 4 horas de estado estacionário observou-se um aumento em relação ao controlo ($\pm 15\%$), deste modo a variação da expressão do gene γ -tubulina é variável com o H_2O_2 a baixas concentrações.

O aumento observado poderá ser compreendido como uma resposta celular à possível diminuição dos níveis de proteína γ -tubulina no centróssoma e no citoplasma observadas anteriormente.

É de realçar que a variação dos níveis de mRNA γ -tubulina ao fim 4 horas de exposição de H_2O_2 parece ser mais significativa quando comparado com o controlo. Todavia, e tendo em conta que a normalização é efectuada ao volume da banda (área e intensidade) compreende-se que os valores de variação da expressão do gene γ -tubulina sejam menores.

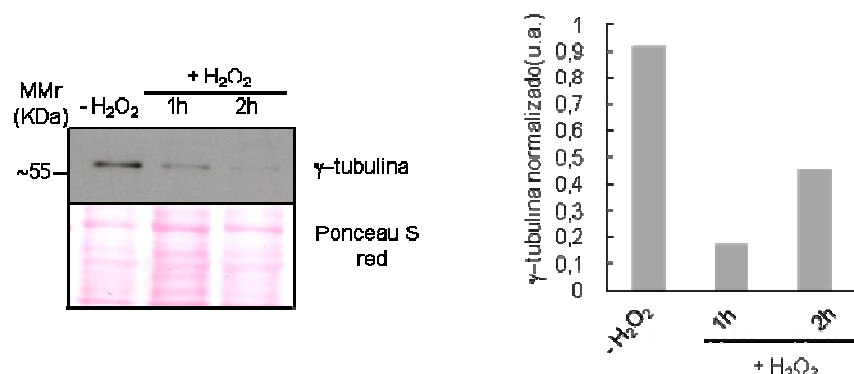
Atendendo a estes resultados preliminares seria interessante efectuar a análise da variação de expressão deste gene ao longo de mais tempos de exposição de H_2O_2 de modo a obter uma

melhor descrição da variabilidade do transcrito. Além disso, esta análise poder-se-ia efectuar por PCR *real-time* e deste modo obter uma melhor descrição da variação dos níveis do gene em estudo.

IV.2 Análise da influência do H_2O_2 nos níveis da proteína γ -tubulina em células RPE-1

Com o objectivo de complementar o estudo comparativo a variação da γ -tubulina induzida pelo H_2O_2 entre células tumorais e células normais foi efectuada uma experiência preliminar numa linha celular não tumoral, RPE-1 exposta a baixas concentrações de H_2O_2 .

A – Extractos de proteínas citosólicas



B – Sedimentos

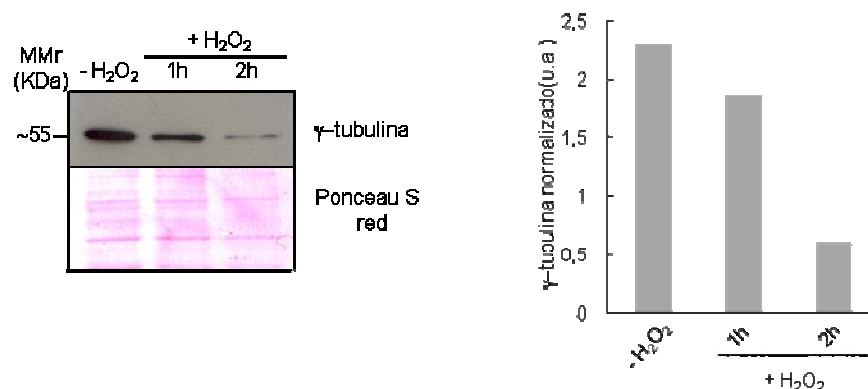


Figura III.15: Níveis da proteína γ -tubulina na fracção citosólica (A) e no sedimento solubilizado (B) em células RPE-1 expostas a 10 μ M de H_2O_2 em estado estacionário durante 1 e 2 horas e respectiva quantificação normalizada à coloração da membrana por Ponceau S red (à direita). Foram preparados extractos proteicos citosólicos e solubilizados as fracções insolúveis sem qualquer etapa de lavagem ou purificação adicional. Cerca de 60 μ g de proteínas citosólicas e o sedimento solúvel de cada fracção aos diferentes tempos foram analisados num gel SDS-PAGE 12% (m/v) seguido de um *western blot* utilizando um anticorpo contra a γ -tubulina determinou-se a variação dos níveis de proteína γ -tubulina. Efectuou-se ainda o controlo de *loading* da fracção de proteínas citosólicas pelo *re-blotting* da membrana de nitrocelulose utilizando um anticorpo contra a actina. Este resultado é único e preliminar.

A análise da figura III.15 mostra que os níveis de γ -tubulina ao fim de 1 hora de exposição de células RPE-1 a 10 μ M de H_2O_2 se apresentam quase ausente na fracção citosólica (figura

III.15 A). Ao fim de duas horas, tempo final de exposição à concentração sub-letal, observa-se uma recuperação da γ -tubulina nesta fracção porém, bastante abaixo comparativamente às células sem qualquer tratamento ($-H_2O_2$). Embora os resultados sejam preliminares encontram-se de acordo com o observado por *western blot* para esta mesma fracção em células HeLa, isto é, tanto para as células HeLa como para as RPE-1 se observa uma diminuição dos níveis de proteína no citoplasma. Contudo, no caso do estudo efectuado nas células HeLa, os níveis de γ -tubulina tendem a diminuir ao longo do tempo, não se observando qualquer recuperação dos níveis desta como no presente ensaio. Ainda que, nas células HeLa, os níveis de proteína diminuam ao longo do tempo, as células RPE-1 apresentaram uma diminuição muito mais drástica e precoce. Estes resultados poderão mostrar uma resposta fisiológica da exposição de H_2O_2 a concentrações sub-letais em estado estacionário distinta ao nível da sua intensidade entre linhas celulares tumorais e células fenotipicamente normais.

Na figura III.15 B encontram-se os resultados obtidos para as diferentes fracções de sedimento solubilizado de células RPE-1 expostas a 10 μ M de H_2O_2 durante 1 e 2h. De modo análogo à fracção citosólica, observa-se nesta linha celular uma diminuição dos níveis de γ -tubulina ao longo do tempo.

O estudo efectuado por *western blot* em células HeLa não permitiu inferir qualquer variação dos níveis de γ -tubulina nos extractos nucleares, todavia, estes resultados não contrariam a diminuição de intensidade da γ -tubulina nos centróssomas de células HeLa expostas a 25 μ M de H_2O_2 em estado estacionário ao longo de 2 e 4 horas, ver figura III.9. A não detecção desta diminuição nas células HeLa poder-se-á dispersão estatística observada para esse resultado, como discutido anteriormente.

Com o fim de completar o estudo da influência do H_2O_2 na proteína γ -tubulina em células RPE-1 poder-se-ão realizar estudos análogos aos efectuados para as células HeLa, como estudar a presença/ausência da proteína no centróssoma, estudar a capacidade de nucleação por parte do centróssoma recorrendo à técnica de microscopia de imunofluorescência indirecta ou ainda, avaliar o padrão de expressão do gene γ -tubulina de células RPE-1 submetidas a um estado estacionário de H_2O_2 . Através destes estudos poder-se-á compreender se células fenotipicamente normais (como as células RPE-1) apresentam uma modulação dos níveis de γ -tubulina mais dramática ou, se por exemplo o seu centróssoma é mais afectado, quando são exposta a concentrações sub-letais de H_2O_2 .

Capítulo IV – Conclusões e perspectivas

O H_2O_2 é uma espécie reactiva de oxigénio (ERO) continuamente produzida *in vivo*, que apresenta diferentes funções celulares consoante a concentração a que se encontra presente. Quando presente a baixas concentrações (nM– μM) o H_2O_2 participa na sinalização de algumas vias essenciais à célula, como por exemplo a modulação de vias sinalizadoras durante o processo inflamatório (revisto em Oliveira-Marques *et al*, 2009).

As ERO têm vindo a ser relacionadas com o desenvolvimento de diversas doenças neurológicas (Tabner *et al*, 2005), com a diabetes (Fang *et al*, 2009) e, ainda como participantes no início, progressão e desenvolvimento tumoral (revisto em Acharya *et al*, 2010).

O presente trabalho teve como principal objectivo investigar o papel do H_2O_2 , a concentrações sinalizadoras, nas funções das proteínas TBCCD1 e γ -tubulina e, possíveis implicações desta ERO na cancerigénese por vias que envolvam estas proteínas. Para tal, estudou-se a influência do H_2O_2 numa linha celular tumoral e numa linha celular normal com telomerase imortalizado, células HeLa e RPE-1, respectivamente.

As células foram expostas a concentrações reguladoras de H_2O_2 pela titulação deste em estado estacionário (Antunes & Cadenas, 2000) a concentrações sub-letais, pelo que este método representou a base de todo o trabalho experimental realizado.

Assim, pela execução do presente trabalho foi possível otimizar as condições da exposição controlada de H_2O_2 em células RPE-1 pela sua titulação em estado estacionário. A optimização deste método consistiu numa nova ferramenta disponível para o estudo de stress oxidativo e, da regulação da sinalização e modulação de processos celulares induzidos pelo H_2O_2 na linha celular RPE-1.

O TBCCD1 é uma proteína centrossomal relacionada com o cofactor C (TBCC) e a proteína RP2 (Gonçalves *et al*, 2010; Gonçalves, 2010; Feldman *et al*, 2009). A sua recente caracterização mostrou que este é um potencial regulador do posicionamento do centrossoma e da organização citoplasmática (Gonçalves *et al*, 2010; Feldman *et al*, 2009), contudo ainda se desconhece a função específica desta proteína.

Estudos preliminares da exposição de concentrações sub-letais de H_2O_2 em estado estacionário a células HeLa e células RPE-1 TBCCD1-GFP Clone 5 (linha celular que sobre-expressa constitutivamente a proteína de fusão TBCCD1-GFP) mostraram que os níveis de TBCCD1 são sensível à exposição deste. Mais, mostraram que tal como a proteína RP2 (Yoon *et al*, 2006), a presença de H_2O_2 leva ao aumento dos níveis desta ao longo do tempo.

Uma vez que a proteína de fusão TBCCD1-GFP variou de modo semelhante à proteína endógena, pode-se supor que o TBCCD1 seja regulado pós-transcricionalmente pelo H_2O_2 . A velocidade de consumo de H_2O_2 parece ser directamente relacionável com aumento desta proteína. Isto porque, a presença de uma maior quantidade de TBCCD1-GFP foi sinónimo de um aumento da velocidade de consumo de H_2O_2 nas diferentes linhas celulares RPE-1 TBCCD1-GFP estudadas. Com fim a compreender a relação entre o aumento de TBCCD1-GFP e o consumo de H_2O_2 por células intactas efectuou-se um estudo de uma linha celular RPE-1 TBCCD1-GFP que apresentou uma diferença com significado estatístico face aos controlos (RPE-1 e RPE-1 GFP). Para tal, procedeu-se à análise do tamanho desta linha celular e à determinação da actividade do catalase. Estes dois estudos mostraram-se inconclusivos, isto porque, por um lado, embora a sobre-expressão da proteína TBCCD1-GFP não altere o tamanho celular, esta linha monoclonal deverá ter sido obtida a partir de uma célula relativamente maior dentro da heterogeneidade normal do tamanho das células RPE-1. Por outro lado, os estudos da velocidade de degradação do H_2O_2 pelo catalase evidenciaram uma possível alteração do enzima contudo, será necessário confirmar se existe uma diferença com significado estatístico.

Assim, será necessário realizar estudos complementares, como a determinação do gradiente de H_2O_2 nas diferentes linhas RPE-1 TBCCD1-GFP, para esclarecer esta possível correlação.

Estudos preliminares, por RT-PCR semi-quantitativo, mostraram um decréscimo do nível de mRNA do TBCCD1 ao longo do tempo de exposição do H_2O_2 em células HeLa. Observou-se ainda uma influência do H_2O_2 na expressão dos genes *tbcc* e *rp2* análoga a variação do gene *tbccd1*.

Uma vez que o TBCCD1 e a RP2 apresentam variações dos seus níveis de proteína comparáveis e que a variação dos genes *tbccd1*, *tbcc* e *rp2* parece ser similar, o conjunto dos resultados sugere a possibilidade das proteínas TBCCD1, cofactor C e RP2 serem sensíveis à presença de H_2O_2 a concentrações sinalizadoras. Isto é, o H_2O_2 poderá modular de modo idêntico, directa ou indirectamente estas três proteínas.

Os diferentes resultados efectuados, embora que preliminares, mostram que os níveis da proteína TBCCD1 alteram-se após a célula ser exposta a H_2O_2 e que, possivelmente estará relacionada directa ou indirectamente com uma função no metabolismo do H_2O_2 , dado que a sua sobre-expressão altera a velocidade de consumo desta ERO.

A relação do TBCCD1 com o H_2O_2 em condições de sub-letalidade, e a sua possível relação com a cancerigénese, carece de uma melhor caracterização a qual envolve nomeadamente:

- i) ensaios de microscopia de fluorescência para analisar possíveis variações de intensidade da marcação da proteína no centróssoma;

- ii) a análise de outros enzimas responsáveis pelo metabolismo do H_2O_2 em células que sobre-expressam a proteína de fusão TBCCD1-GFP e também, a análise da membrana plasmática destas de modo a compreender a relação entre o aumento da velocidade de consumo desta ERO e a sobre-expressão de TBCCD1;
- iii) a optimização do método de extracção de proteínas nucleares (a qual comporta as proteínas do centróssoma) para uma melhor análise da variação de níveis de TBCCD1 por *western blot*, possivelmente com significado estatístico;
- iv) uma vez confirmado os níveis de expressão do gene *tbccd1*, *tbcc* e *rp2* em células HeLa, será interessante realizar um estudo semelhante a este em células RPE-1 e estudar o conjunto destas proteínas nestas duas linhas celulares.

O planeamento destes diferentes estudos ajudará e complementarará o esclarecimento da hipótese de trabalho pois poderão ser descritos novos mecanismos de regulação do TBCCD1 e possivelmente novos papéis a nível celular desta proteína.

Já existiam evidências de que os microtúbulos eram afectados pelo H_2O_2 , designadamente a despolimerização da rede de microtúbulos por altas concentrações deste (Valen *et al*, 1999). Por sua vez, a exposição de células MCF-7 a concentrações sinalizadoras de H_2O_2 , pela sua titulação em estado estacionário, induzem alterações na organização do citoesqueleto de microtúbulos (Pedroso, 2003).

A execução deste trabalho permitiu atribuir um papel ao H_2O_2 na modulação e localização de uma das principais proteínas na nucleação dos microtúbulos, a γ -tubulina. E ainda, uma influência desta proteína na organização dos microtúbulos na presença de H_2O_2 .

A análise dos níveis de γ -tubulina por *western blot* mostrou que estes diminuem significamente, aproximadamente 42 % no citoplasma, após as células terem sido submetidas a um estado estacionário de H_2O_2 em células HeLa a concentrações sub-letais durante 4 horas. A complementação deste estudo por microscopia de imunofluorescência indirecta permitiu observar uma clara redução de intensidade de γ -tubulina no centróssoma. Na linha celular RPE-1, resultados preliminares obtidos por *western blot*, mostraram-se semelhantes aos obtidos nas células HeLa. Deste modo, ambos os estudos mostram a influência do H_2O_2 nos níveis de proteína γ -tubulina. Porém, estes deverão ser complementados de modo a compreender-se se a γ -tubulina está a ser apenas deslocada, ou efectivamente a ser degradada por exemplo, através da determinação do nível de ubiquitinação desta quando as células são sujeitas a um estado estacionário de H_2O_2 .

A diminuição dos níveis de γ -tubulina no centróssoma, em células HeLa, sugere uma alteração da capacidade de nucleação de microtúbulos por este organelo. Estudos da capacidade nucleadora de microtúbulos do centróssoma mostraram que esta está afectada pois, depois da acção do nocodazole, um agente despolimerizador de microtúbulos, e sua remoção, a repolimerização da rede de microtúbulos ocorreu de forma desorganizada. Observou-se ainda evidências da presença de uma nucleação de microtúbulos acentrossomal.

Deste modo, será importante proceder a estudos adicionais para identificar quais são os centros organizadores de microtúbulos acentrossomais envolvidos e, se algumas das funções dos microtúbulos, como a organização de organelos, está alterada.

O facto das alterações na rede de microtúbulos observadas serem semelhantes às descritas para a exposição de concentrações sub-letais de H_2O_2 em células MCF-7, em estado estacionário (Pedroso, 2003) sugerem que a diminuição da γ -tubulina, nomeadamente no centróssoma, poderá conduzir o citoesqueleto de microtúbulos a uma nova organização, após exposição ao H_2O_2 .

A realização de estudos suplementares poderão explicar como o H_2O_2 , a concentrações sinalizadoras, através do seu papel directo ou indirecto na modulação da regulação da γ -tubulina será capaz de influenciar o normal funcionamento da célula.

Em conclusão, o presente trabalho constitui uma nova abordagem na análise do papel do H_2O_2 no centróssoma, uma vez que se procura compreender bioquimicamente qual o efeito desta ERO em proteínas específicas, no caso do presente estudo qual o efeito do H_2O_2 nas proteínas TBCCD1 e γ -tubulina. Este trabalho representa apenas o início desta abordagem, pelo que são requeridos ensaios complementares para compreender a função do H_2O_2 no centróssoma e em última análise, qual a influência desta ERO na cancerigénese via centróssoma.

Capítulo V – Referências

- Acharya MM, Lan ML, Kan VH, Patel NH, Giedzinski E, Tseng BP, Limoli CL (2010) Consequences of ionizing radiation-induced damage in human neural stem cells. *Free Radic Biol Med.* **6**:[em impressão]
- Aebi H (1984) Catalase in vitro In: *Methods Enzymol.* Packer L (Editor), **105**:121-126. Academic Press, New York.
- Amos LA, Schlieper D. (2005) Microtubules and maps. *Adv Protein Chem.* **71**: 257-298.
- Andersen SS (1999) Molecular characteristics of the centrosome. *Int Rev Cytol.* **187**: 51-109.
- Antunes F, Cadenas E (2001) Cellular titration of apoptosis with steady state concentrations of H₂O₂: submicromolar levels of H₂O₂ induce apoptosis through Fenton chemistry independent of the cellular thiol state. *Free Radic Biol Med.* **30**: 1008-1018.
- Antunes F, Cadenas E, Brunk UT (2001) Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H₂O₂ is a consequence of lysosomal rupture. *Biochem J.* **356**: 549-555.
- Antunes F, Han D, Cadenas E (2002) Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radic. Biol. Med.* **33**: 1260-1267
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* **55**: 373-399.
- Archer JE, Vega LR, Solomon F (1995) Rbl2p, a yeast protein that binds to beta-tubulin and participates in microtubule function in vivo. *Cell.* **82**:425-434.
- Bartolini F, Gundersen GG (2006) Generation of noncentrosomal microtubule arrays. *J Cell Sci.* **119**: 4155-63.
- Bartolini F, Tian G, Piehl M, Cassimeris L, Lewis SA, Cowan NJ (2005) Identification of a novel tubulin-destabilizing protein related to the chaperone cofactor E. *J Cell Sci.* **118**:1197-1207.
- Basto, R., Brunk, K., Vinadogrova, T., Peel, N., Franz, A., Khodjakov, A., Raff, JW (2008) Centrosome amplification can initiate tumourigenesis in flies. *Cell.* **133**: 1032-1042.

Bertling E, Hotulainen P, Mattila PK, Matilainen T, Salminen M, Lappalainen P (2004) Cyclase-associated protein 1 (CAP1) promotes cofilin-induced actin dynamics in mammalian nonmuscle cells. *Mol Biol Cell*. **15**: 2324-2334.

Bettencourt-Dias M, Glover DM (2007) Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **8**: 451-463.

Bettencourt-Dias M, Rodrigues-Martins A, Carpenter L, Riparbelli M, Lehmann L, Gatt MK, Carmo N, Balloux F, Callaini G, Glover DM (2005) SAK/PLK4 is required for centriole duplication and flagella development. *Curr Biol*. **15**: 2199-2207.

Bhamidipati A, Lewis SA, Cowan NJ (2000) ADP ribosylation factor-like protein 2 (Arl2) regulates the interaction of tubulin-folding cofactor D with native tubulin. *J Cell Biol*. **149**: 1087-1096.

Bjerrum OJ, Schafer-Nielsen C.(1986) *Analytical Electrophoresis*, ed. Dunn MJ, **315**; Verlag Chemie, Weinheim.

Bornens M, Moudjou M (1999) Studying the composition and function of centrosomes in vertebrates. *Methods Cell Biol*. **61**: 13-34.

Bouissou A, Vérollet C, Sousa A, Sampaio P, Wright M, Sunkel CE, Merdes A, Raynaud-Messina B (2009) γ -Tubulin ring complexes regulate microtubule plus end dynamics. *J Cell Biol*. **187**: 327-334.

Bourke E, Dodson H, Merdes A, Cuffe L, Zachos G, Walker M, Gillespie D, Morrison CG (2007) DNA damage induces Chk1-dependent centrosome amplification. *EMBO Rep*. **8**: 603-609.

Bradford M (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding *Anal. Biochem*. **72**: 248-254.

Brinkley BR, Goepfert TM (1998) Supernumerary centrosomes and cancer: Boveri's hypothesis resurrected. *Cell Motil Cytoskeleton*. **41**: 281-288.

Brown NS, Bicknell R (2001) Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res*. **3**: 323-327.

Campo R, Fontalba A, Sanchez LM, Zabala JC (1994) A 14 kDa release factor is involved in GTP-dependent beta-tubulin folding. *FEBS Lett*. **353**: 162-166.

Chabin-Brion K, Marceiller J, Perez F, Settegrana C, Drechou A, Durand G, Poüs C. (2001) The Golgi complex is a microtubule-organizing organelle. *Mol Biol Cell*. **12**: 2047-2060.

Chae S, Yun C, Um H, Lee JH, Cho H (2005) Centrosome amplification and multinuclear phenotypes are induced by hydrogen peroxide. *Exp Mol Med*. **37**: 482-487.

Chapple JP, Grayson C, Hardcastle AJ, Bailey TA, Matter K, Adamson P, Graham CH, Willison KR, Cheetham ME (2003) Organization on the plasma membrane of the retinitis pigmentosa protein RP2: investigation of association with detergent-resistant membranes and polarized sorting. *Biochem J*. **372**: 427-433.

Chapple JP, Hardcastle AJ, Grayson C, Willison KR, Cheetham ME (2002) Delineation of the plasma membrane targeting domain of the X-linked retinitis pigmentosa protein RP2. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **43**:2015-2020.

Cho EH, Whipple RA, Matrone MA, Balzer EM, Martin SS. (2010) Delocalization of gamma-tubulin due to increased solubility in human breast cancer cell lines. *Cancer Biol Ther*. **9**: 66-76.

Coelho MC (2005) Estudo genético da biogénese ciliar em *Tetrahymena Thermophila*, Relatório de estágio da licenciatura de Bioquímica, FC, UL.

Conde C, Cáceres A (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci*. **10**: 319-332.

Cunningham LA, Kahn RA. (2008) Cofactor D functions as a centrosomal protein and is required for the recruitment of the gamma-tubulin ring complex at centrosomes and organization of the mitotic spindle. *J Biol Chem*. **283**: 7155-7165.

DalleDonne I, Milzani A, Colombo R (1995) H₂O₂-treated actin: assembly and polymer interactions with cross-linking proteins. *Biophys J*. **69**: 2710-2719.

de Oliveira-Marques V, Cyrne L, Marinho HS, Antunes F (2007) A quantitative study of NF-kappaB activation by H₂O₂: relevance in inflammation and synergy with TNF-alpha. *J Immunol*. **178**: 3893-3902.

Debec A, Sullivan W, Bettencourt-Dias M (2010) Centrioles: active players or passengers during mitosis? *Cell Mol Life Sci*. **67**: 2173-2194.

Del Rey J, Prat E, Ponsa I, Lloreta J, Gelabert A, Algaba F, Camps J, Miró R (2010) Centrosome clustering and cyclin D1 gene amplification in double minutes are common events in chromosomal unstable bladder tumors. *BMC Cancer*. **10**: 280

Delaval B, Doxsey SJ (2010) Pericentrin in cellular function and disease. *J Cell Biol*. **188**: 181-190.

Desai A, Mitchison T (1997) J Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **13**: 83-117.

Dictenberg JB, Zimmerman W, Sparks CA, Young A, Vidair C, Zheng Y, Carrington W, Fay FS, Doxsey SJ (1998) Pericentrin and gamma-tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome. *J Cell Biol*. **141**: 163-174.

Dodson H, Bourke E, Jeffers LJ, Vagnarelli P, Sonoda E, Takeda S, Earnshaw WC, Merdes A, Morrison C (2004) Centrosome amplification induced by DNA damage occurs during a prolonged G2 phase and involves ATM. *EMBO J*. **23**: 3864-3873.

Domínguez-Giménez P, Brown NH, Martín-Bermudo MD (2007) Integrin-ECM interactions regulate the changes in cell shape driving the morphogenesis of the *Drosophila* wing epithelium *Journal of Cell Science*. **120**: 1061-1071

Doxsey S (2001) Re-evaluating centrosome function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2**: 688-698.

Dröge W (2002) Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp Gerontol*. **37**:1333-1345.

Evans P, Halliwell B (1999) Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Ann NY Acad Sci*. **884**:19-40.

Evans RJ, Schwarz N, Nagel-Wolfrum K, Wolfrum U, Hardcastle AJ, Cheetham ME (2010) The retinitis pigmentosa protein RP2 links pericentriolar vesicle transport between the Golgi and the primary cilium. *Hum Mol Genet*. **19**: 1358-1367.

Fanarraga ML, Bellido J, Jaén C, Villegas JC, Zabala JC (2010) TBCD links centriologenesis, spindle microtubule dynamics, and midbody abscission in human cells. *PLoS One*. **5**: e8846.

Fanarraga ML, Párraga M, Aloria K, del Mazo J, Avila J, Zabala JC (1999) Regulated expression of p14 (cofactor A) during spermatogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton*. **43**: 243-254.

Fanelli M, Fantozzi A, De Luca P, Caprodossi S, Matsuzawa S, Lazar MA, Pelicci PG, Minucci S.(2004) The coiled-coil domain is the structural determinant for mammalian homologues of Drosophila Sina-mediated degradation of promyelocytic leukemia protein and other tripartite motif proteins by the proteasome. *J Biol Chem.* **279**: 5374-5379.

Fang J, Seki T, Maeda H (2009) Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv Drug Deliv Rev.* **61**: 290-302.

Feldman JL, Marshall WF (2009) ASQ2 encodes a TBCC-like protein required for mother–daughter centriole linkage and mitotic spindle orientation. *Curr Biol* **19**: 1238–1243.

Folmer V, Pedroso N, Matias AC, Lopes SC, Antunes F, Cyrne L, Marinho HS (2008) H₂O₂ induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* *Biochim Biophys Acta.* **1778**:1141-1147.

Fuller SD, Gowen BE, Reinsch S, Sawyer A, Buendia B, Wepf R, Karsenti E. *Curr.* (1995) The core of the mammalian centriole contains gamma-tubulin. *Biol.* **5**: 1384-1393.

Gershoni JM, Palade GE (1983) Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem.***131**:1-15

Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG (1994) Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Physiol rev.* **74**: 139-162.

Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG (2007) Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**: 722-728.

Gonçalves J, Nolasco S, Nascimento R, Lopez Fanarraga M, Zabala JC, Soares H (2010) TBCCD1, a new centrosomal protein, is required for centrosome and Golgi apparatus positioning.. *EMBO Rep.* **11**: 194-200

Gonçalves, J (2010) Caracterização da protein centrossomal TBCCD1, em linhas celulares humanas e durante o desenvolvimento de *Danio rerio*. Tese de doutoramento, FC, UL.

Grayson C, Bartolini F, Chapple JP, Willison KR, Bhamidipati A, Lewis SA, Luthert PJ, Hardcastle AJ, Cowan NJ, Cheetham ME (2002) Localization in the human retina of the X-linked retinitis pigmentosa protein RP2, its homologue cofactor C and the RP2 interacting protein Arl3. *Hum Mol Genet.* **11**: 3065-3074

Grynberg M, Jaroszewski L, Godzik A (2003) Domain analysis of the tubulin cofactor system: a model for tubulin folding and dimerization. *BMC Bioinformatics*. **10**: 4-46.

Grynberg M, Jaroszewski L, Godzik A (2003) Domain analysis of the tubulin cofactor system: a model for tubulin folding and dimerization. *BMC Bioinformatics*. **4**: 46.

Hage-Sleiman R, Herveau S, Matera EL, Laurier JF, Dumontet C. (2010) Tubulin binding cofactor C (TBCC) suppresses tumor growth and enhances chemosensitivity in human breast cancer cells. *BMC Cancer*. **12**: 10:135.

Hardcastle AJ, Thiselton DL, Van Maldergem L, Saha BK, Jay M, Plant C, Taylor R, Bird AC, Bhattacharya S (1999) Mutations in the RP2 gene cause disease in 10% of families with familial X-linked retinitis pigmentosa assessed in this study. *Am J Hum Genet*. **64**: 1210-1215

Hartwell LH, Kastan MB (1994) Cell cycle control and cancer. *Science*. **266**: 1821-1828

Imlay JA (2008) Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem*. **77**: 755-776.

Janke C, Rogowski K, van Dijk J (2008) Polyglutamylation: a fine-regulator of protein function? 'Protein Modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep*. **9**: 636-641.

Jin S, Pan L, Liu Z, Wang Q, Xu Z, Zhang YQ. (2009) Drosophila Tubulin-specific chaperone E functions at neuromuscular synapses and is required for microtubule network formation. *Development*. **136**:1571-81.

Kamata H, Hirata H (1999) Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal*. **11**:1-14

Kanai M, Tong WM, Sugihara E, Wang ZQ, Fukasawa K, Miwa M (2003) Involvement of poly(ADP-Ribose) polymerase 1 and poly(ADP-Ribosyl)ation in regulation of centrosome function. *Mol Cell Biol*. **23**: 2451-2462.

Kortazar D, Carranza G, Bellido J, Villegas JC, Fanarraga ML, Zabala JC (2006) Native tubulin-folding cofactor E purified from baculovirus-infected Sf9 cells dissociates tubulin dimers. *Protein Expr Purif*. **49**: 196-202.

Kortazar D, Fanarraga ML, Carranza G, Bellido J, Villegas JC, Avila J, Zabala JC (2007) Role of cofactors B (TBCB) and E (TBCE) in tubulin heterodimer dissociation. *Exp Cell Res*. **313**: 425-436.

- Krämer A, Ho AD (2001) Centrosome aberrations and cancer. *Onkologie*. **24**: 538-544.
- Kuwahara H, Miyamoto Y, Akaike T, Kubota T, Sawa T, Okamoto S, Maeda H (2000) *Helicobacter pylori* urease suppresses bactericidal activity of peroxynitrite via carbon dioxide production. *Infect Immun*. **68**: 4378-4383.
- Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Lange BM (2002) Integration of the centrosome in cell cycle control, stress response and signal transduction pathways. *Curr Opin Cell Biol*. **14**: 35-43.
- Le Moan N, Clement G, Le Maout S, Tacnet F, Toledano MB (2006) The *Saccharomyces cerevisiae* proteome of oxidized protein thiols: contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways. *J Biol Chem*. **281**: 10420-10430.
- Lewis SA, Cowan NJ. (2002) Bad chaperone. *Nat Med*. **8**:1202-1203
- Llorca O, Martín-Benito J, Ritco-Vonsovici M, Grantham J, Hynes GM, Willison KR, Carrascosa JL, Valpuesta JM (2000) Eukaryotic chaperonin CCT stabilizes actin and tubulin folding intermediates in open quasi-native conformations. *EMBO J*. **19**: 5971-5979.
- Llosa M, Aloria K, Campo R, Padilla R, Avila J, Sánchez-Pulido L, Zabala JC (1996) The beta-tubulin monomer release factor (p14) has homology with a region of the DnaJ protein. *FEBS Lett*. **397**: 283-289.
- Lopez-Fanarraga M, Avila J, Guasch A, Coll M, Zabala JC (2001) Review: postchaperonin tubulin folding cofactors and their role in microtubule dynamics. *J Struct Biol*. **135**: 219-229.
- Lopez-Fanarraga M, Carranza G, Bellido J, Kortazar D, Villegas JC, Zabala JC (2007) Tubulin cofactor B plays a role in the neuronal growth cone. *J Neurochem*. **100**: 1680-1687.
- Lubbers LS, Rowe BA, Hodge LM, Browne SE, Gundersdorf R, Jones P, Hess FJ, Reynolds IJ (2010) PISA, a novel pharmacodynamic assay for assessing poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activity in situ. *J Pharmacol Toxicol Methods*. **61**: 319-328.
- Lüders J, Stearns T (2007) Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **8**: 161-167.

Marques-Oliveira, V (2008) Redox regulation of NF-KB activation by hydrogen peroxide and effects on gene expression Tese de doutoramento, FC, UL.

Martín L, Fanarraga ML, Aloria K, Zabala (2000) Tubulin folding cofactor D is a microtubule destabilizing protein. *JC. FEBS Lett.* **470**: 93-95.

McDermott KM, Zhang J, Holst RC, Kozakiewicz BK, Singla V and Tlsty TD (2006) p16INK4a Prevents Centrosome Dysfunction and Genomic Instability in Primary Cells. *PLoS Biol.* **4**: e51

McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, Mahboubi A, Shi Y, Mogil RJ, Nishioka WK, Green DR (1995). The end of the (cell) line: Methods for the study of apoptosis in vitro. In *Methods in Cell Biology: Cell Death*. ed. Schwartz, L.M. and Osborne, **46**: 153-187, New York: Academic Press.

Meadus WJ (2003) A semi-quantitative RT-PCR method to measure the in vivo effect of dietary conjugated linoleic acid on porcine muscle PPAR gene expression. *Biol Proced Online.* **5**: 20-28.

Mitchison T, Kirschner M (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature.* **312**: 237-42

Müller et al. (Reports, 27 October 2006, p. 654) em Taylor SS, Hardwick KG, Sawin KE, Biggins S, Piatti S, Khodjakov A, Rieder CL, Salmon ED, Musacchio A (2007) Comment on "A centrosome-independent role for gamma-TuRC proteins in the spindle assembly checkpoint" *Science* 18;316:982; author reply 982.

Nigg EA (2002) Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression?. *Nat Rev Cancer.* **2**: 815-825.

Nigg EA (2006) Origins and consequences of centrosome aberrations in human cancers. *Int J Cancer.* **119**: 2717-2723.

Nogales E (2000) Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem.* **69**: 277-302

Nogales E (2001) Biophys Biomol Struct Structural insight into microtubule function. *Annu Rev.* **30**: 397-420.

Nolasco S, Bellido J, Gonçalves J, Zabala JC, Soares H (2005) Tubulin cofactor A gene silencing in mammalian cells induces changes in microtubule cytoskeleton, cell cycle arrest and cell death *FEBS Lett.* **579**: 3515-3524.

Oakley CE, Oakley BR (1989) Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature*. **338**: 662-664.

Okano S, Lan L, Tomkinson AE, Yasui A. (2005) Translocation of XRCC1 and DNA ligase IIIalpha from centrosomes to chromosomes in response to DNA damage in mitotic human cells. *Nucleic Acids Res*. **33**: 422-429.

Oliveira-Marques V (2003) Ativação do NF-kB induzida por concentrações baixas e estacionárias de H₂O₂ em células MCF-7, Relatório de estágio da licenciatura de Bioquímica, FC, UL.

Oliveira-Marques V, Marinho HS, Cyrne L, Antunes F (2009) Role of hydrogen peroxide in NF-kappaB activation: from inducer to modulator. *Antioxid Redox Signal*. **11**: 2223-2243.

Pedroso N, (2003) Função do citoesqueleto na activação do NF-kB pelo H₂O₂, Relatório de estágio da licenciatura de Bioquímica, FC, UL.

Pereira G, Schiebel E (1997) Centrosome-microtubule nucleation. Review: *J Cell Sci*.**110**: 295-300.

Piehl M, Tulu US, Wadsworth P, Cassimeris L (2004) Centrosome maturation: measurement of microtubule nucleation throughout the cell cycle by using GFP-tagged EB1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**: 1584-1588.

Postel EH, Berberich SJ, Flint SJ, Ferrone CA (1993) Human c-myc transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis. *Science*. **261**: 478-480.

Quintas A, Freire AP, Halpern MJ (2008) Bioquímica - Organização Molecular da Vida, Lidel, 1Ed, Lisboa, Portugal.

Ramakrishna M, Williams LH, Boyle SE, Bearfoot JL, Sridhar A, Speed TP, Gorringer KL, Campbell IG (2010) Identification of candidate growth promoting genes in ovarian cancer through integrated copy number and expression analysis. *PLoS One*. **5**: e9983.

Rao RK, Clayton LW (2002) Regulation of protein phosphatase 2A by hydrogen peroxide and glutathionylation. *Biochem Biophys Res Commun*. **293**: 610-616

- Rayala SK, Martin E, Sharina IG, Molli PR, Wang X, Jacobson R, Murad F, Kumar R (2007) Dynamic interplay between nitration and phosphorylation of tubulin cofactor B in the control of microtubule dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**: 19470-19475
- Rémy-Kristensen A, Duportail G, Coupin G, Kuhry JG (2000) The influence of microtubule integrity on plasma membrane fluidity in L929 cells. *Mol Membr Biol*. **17**: 95-100
- Riggs JL, Seiwald RJ, Burckhalter JH, Downs CM, Metcalf TG. (1958) Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. *Am J Pathol*. **34**: 1081-1097.
- Rios RM, Bornens M (2003) The Golgi apparatus at the cell centre. *Curr Opin Cell Biol*. **15**: 60-66.
- Roebuck KA, Rahman A, Lakshminarayanan V, Janakidevi K, Malik AB (1995) H₂O₂ and tumor necrosis factor- α activate intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene transcription through distinct cis-regulatory elements within the ICAM-1 promoter *J. Biol Chem*. **270**: 18966-18974.
- Roychowdhury M, Sarkar N, Manna T, Bhattacharyya S, Sarkar T, Basusarkar P, Roy S, Bhattacharyya B. (2000) Sulfhydryls of tubulin. A probe to detect conformational changes of tubulin. *Eur J Biochem*. **267**: 3469-3476.
- Saito A, Hayashi T, Okuno S, Nishi T, Chan PH (2004) Oxidative stress affects the integrin-linked kinase signaling pathway after transient focal cerebral ischemia. *Stroke*. **35**: 2560-2565.
- Saladino C, Bourke E, Conroy PC, Morrison CG (2009) Centriole separation in DNA damage-induced centrosome amplification.. *Environ Mol Mutagen*. **50**: 725-732.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Vol. 1,2,3, Harbor Laboratory Press, NY.
- Sambrook J, Russell D (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schwahn U, Lenzner S, Dong J, Feil S, Hinzmann B, van Duijnhoven G, Kirschner R, Hemberger M, Bergen AA, Rosenberg T, Pinckers AJ, Fundele R, Rosenthal A, Cremers FP, Ropers HH, Berger W (1998) Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2. *Nat Genet*. **19**:327-32.

Schwahn U, Paland N, Techritz S, Lenzner S, Berger W (2001) Mutations in the X-linked RP2 gene cause intracellular misrouting and loss of the protein. *Hum Mol Genet.* **10**:1177-1183.

Sellin ME, Holmfeldt P, Stenmark S, Gullberg M (2008) Global regulation of the interphase microtubule system by abundantly expressed Op18/stathmin. *Mol Biol Cell.* **19**:2897-2906

Shern JF, Sharer JD, Pallas DC, Bartolini F, Cowan NJ, Reed MS, Pohl J, Kahn RA (2003) Cytosolic Arl2 is complexed with cofactor D and protein phosphatase 2A. *J Biol Chem.* **1278**: 40829-40836

Sies H (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* **82**: 291-295.

Stearns T, Hoyt MA, Botstein D (1990) Yeast mutants sensitive to antimicrotubule drugs define three genes that affect microtubule function. *Genetics.* **124**: 251-262

Stephan A, Vaughan S, Shaw MK, Gull K, McKean PG (2007) An essential quality control mechanism at the eukaryotic basal body prior to intraflagellar transport. *Traffic.* **8**: 1323-1330.

Szymanski D (2002) Tubulin folding cofactors: half a dozen for a dimer *Curr Biol.* **12**: R767-R769.

Tabner BJ, El-Agnaf OM, Turnbull S, German MJ, Paleologou KE, Hayashi Y, Cooper LJ, Fullwood NJ, Allsop D (2005) Hydrogen peroxide is generated during the very early stages of aggregation of the amyloid peptides implicated in Alzheimer disease and familial British dementia. *J Biol Chem.* **280**: 35789-35792.

Tennant DA, Durán RV, Boulahbel H, Gottlieb E (2009) Metabolic transformation in cancer. *Carcinogenesis.* **30**: 1269-1280.

Thannickal VJ, Fanburg BL (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **279**:L1005-L1028.

Tian G, Bhamidipati A, Cowan NJ, Lewis SA (1999) Tubulin folding cofactors as GTPase-activating proteins. GTP hydrolysis and the assembly of the alpha/beta-tubulin heterodimer. *J Biol Chem.* **274**: 24054-24058.

Tian G, Huang MC, Parvari R, Diaz GA, Cowan NJ (2006) Cryptic out-of-frame translational initiation of TBCE rescues tubulin formation in compound heterozygous HRD. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**: 13491-13496.

Tian G, Huang Y, Rommelaere H, Vandekerckhove J, Ampe C, Cowan NJ.(1996) Pathway leading to correctly folded beta-tubulin. *Cell*. **86**: 287-296.

Tian G, Lewis SA, Feierbach B, Stearns T, Rommelaere H, Ampe C, Cowan NJ (1997) Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors. *J Cell Biol*. **138**: 821-832.

Tian G, Thomas S, Cowan NJ (2010) Effect of TBCD and its regulatory interactor Arl2 on tubulin and microtubule integrity. *Cytoskeleton (Hoboken)*. **67**: 706-714.

Tian G, Vainberg IE, Tap WD, Lewis SA, Cowan NJ (1995) Quasi-native chaperonin-bound intermediates in facilitated protein folding. *J Biol Chem*. **270**:23910-23913.

Vadlamudi RK, Barnes CJ, Rayala S, Li F, Balasenthil S, Marcus S, Goodson HV, Sahin AA, Kumar R (2005) p21-activated kinase 1 regulates microtubule dynamics by phosphorylating tubulin cofactor B. *Mol Cell Biol*. **25**: 3726-3736

Valen G, Erl W, Eriksson P, Wuttge D, Paulsson G, Hansson GK (1999) Hydrogen peroxide induces mRNA for tumour necrosis factor alpha in human endothelial cells. *Free Radic Res*. **31**:503-512.

Wang HW, Nogales E. (2005) Nucleotide-dependent bending flexibility of tubulin regulates microtubule assembly. *Nature*. **435**: 911-915.

Wiese C, Zheng Y (2006) Microtubule nucleation: gamma-tubulin and beyond. *J Cell Sci*. **119**: 4143-4153.

Wiese C, Zheng Y. (2000) A new function for the gamma-tubulin ring complex as a microtubule minus-end cap. *Nat Cell Biol*. **2**: 358-364.

Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK (2000) Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis. *Mutat Res*. **448**: 159-177.

Yu, BP (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*.

Zabala JC, Cowan NJ (1992) Tubulin dimer formation via the release of alpha- and beta-tubulin monomers from multimolecular complexes. Zabala JC, Cowan NJ. *Cell Motil Cytoskeleton*. **23**: 222-230.